

DICLER DE SANT'ANNA VITOR BARBIERI

VARIABILIDADE GENÉTICA E PRODUÇÃO DE BIOFILME *IN VITRO* POR  
*Streptococcus mutans* EM ASSOCIAÇÃO COM LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da  
Universidade Federal do Paraná, como requisito  
parcial para a obtenção do grau de Doutor em  
Microbiologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Vânia Aparecida Vicente

CURITIBA

2014

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

**Barbieri, Dicler de Sant'Anna Vitor,**

Variabilidade genética e produção de biofilme *in vitro* por *Streptococcus mutans* em associação com leveduras do gênero *Candida*. / Dicler de Sant'Anna Vitor Barbieri. Curitiba, 2014.  
125f.: il. ; 30cm.

**Orientadora: Vânia Aparecida Vicente**

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Biofilme. 2. Streptococcus mutans. 3. Candida. I. Título II. Vicente, Vânia Aparecida, III Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 576

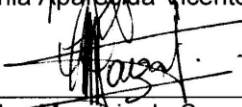


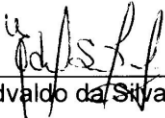
Ministério da Educação  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Patologia Básica  
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia

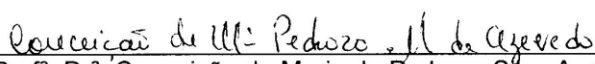
### PARECER

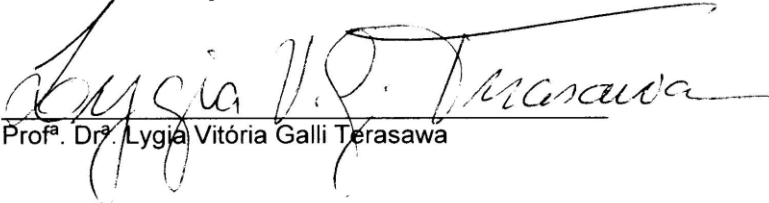
A banca examinadora de defesa de tese de doutorado constituída pelos Professores: orientação e presidência da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vânia Aparecida Vicente – Departamento de Patologia Básica/Setor de Ciências Biológicas da UFPR e a Banca Examinadora constituída pelo Prof. Dr. Wesley Mauricio de Souza do Departamento de Análises Clínicas da UFPR, Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade, do Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da UFPR, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Conceição de Maria de Pedroso Silva Azevedo do Departamento de Medicina da Universidade Federal do Maranhão e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lygia Vitória Galli Terasawa do Departamento de Genética do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Após argüir a doutoranda DICLER DE SANT'ANNA VITOR BARBIERI, sob o título "Variabilidade genética e Produção de biofilme in vitro por Streptococcus mutans em associação com leveduras do gênero Candida" é de parecer favorável à APROVAÇÃO do mesmo. Para a devida publicação, o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Em Curitiba, 14 de fevereiro de 2014.

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vânia Aparecida Vicente - Presidente

  
Prof. Dr. Wesley Mauricio de Souza

  
Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Conceição de Maria de Pedroso Silva Azevedo

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lygia Vitória Galli Terasawa

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela concretização de mais uma etapa, porque Dele, por meio Dele e para Ele são todas as coisas.

Como é bom ter motivos para agradecer, pelo caminho percorrido, pelos desafios superados, pelo sorriso que tornou o dia mais leve, pelo abraço e as palavras de otimismo que dão coragem para seguir em frente.

À minha família, pelo amor que acaricia o coração e faz a gente ver que a vida é maravilhosa junto de quem amamos. Obrigada Gabriel, Lucas e Laura, meus filhos queridos. Nilson, pelo apoio em todos os sentidos, sem você eu não teria concluído esta jornada.

Ao meu Pai e minha Mãe, aos meus irmãos Claudia e Eduardo. Aos meus cunhados Alex e Rosângela, irmãos de coração. Aos meus sobrinhos queridos Beatriz, Pedro, Isadora e Mateus, e toda a minha família, minha grande inspiração.

Aos amigos que fiz durante esta jornada e aos amigos que se distanciaram, mas ainda assim se fizeram presentes, e que enfim espero reencontrar.

À Profa. Dra. Vânia Aparecida Vicente, orientadora deste trabalho, pela dedicação incansável à pesquisa e ao ensino. Desejo a você muita luz e paz em seu coração. Obrigada por tudo.

A todos os professores, funcionários e alunos que compõem o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná. Especialmente a Profa. Dra. Andréa Emilia Marques Stinghen, coordenadora do programa.

À pesquisadora Dra. Renata Rodrigues Gomes, pelo apoio, ensinamentos, amizade e incentivo.

Ao Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade, pela orientação no preparo e análise dos biofilmes para a realização da microscopia de fluorescência confocal, por sua disponibilidade, profissionalismo, amizade e muitos ensinamentos.

À Patricia Fernanda Herkert pelo grande auxílio nas etapas experimentais, pela amizade e carinho.

À Germana, sempre pronta a ajudar, de forma desprendida e gentil.

Aos amigos Jason, Mariana, Gheniffer, que sempre estiveram presentes auxiliando no que fosse necessário. A contribuição de vocês foi muito valiosa, obrigada por tudo.

Às queridas colegas do laboratório, Rafaela, Carol, Camila, Mariana Porsani, Ângela pela convivência e carinho.

Às minhas amigas Mônica e Ivana, que também percorreram esse caminho, obrigada por se fazerem presentes e me inspirarem a continuar.

À Luciana Marques, secretária do Programa de Pós Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia pelas informações e orientações.

À equipe do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, pelas imagens produzidas e por toda a atenção, competência e carinho.

À equipe do Laboratório de Microscopia Confocal Multifotônica da UFPR pelo apoio, profissionalismo e gentileza.

Ao Setor de Micologia e Bacteriologia do Hospital de Clínicas da UFPR pelo auxílio técnico e amizade que sempre marcaram nosso convívio.

A CAPES, CNPq e Fundação Araucária pelo apoio à pesquisa e suporte material.

A todos que por um gesto de apoio engrandeceram este trabalho e fizeram possível sua realização.

*“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”*

*(Antoine de Saint-Exupéry)*

## RESUMO

O presente estudo avaliou isolados de *Streptococcus mutans* e leveduras do gênero *Candida* quanto à capacidade de formação de biofilme *in vitro*, perfil molecular e a interação destes micro-organismos procedentes de saliva e biofilme dental de crianças com diferentes históricos da doença cárie. A partir de amostras de saliva e biofilme de 38 crianças, foram obtidos 83 isolados de *S. mutans* e 31 leveduras do gênero *Candida*, verificando-se 12 (31,5%) indivíduos multicolonizados. Os isolados de *Candida* spp. foram caracterizados quanto à formação de biofilme, assim como, analisados quanto à região parcial do gene D1/D2, ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal e avaliação do perfil genotípico pelo sistema ABC. Um total de 20 isolados de *S. mutans* foram selecionados, sendo 12 procedentes de crianças coinfectadas e 08 de crianças não coinfectadas. Estes foram caracterizados, quanto a formação de biofilme *in vitro* e pelo sequenciamento parcial dos genes *HtrA* e *GtfB*. De acordo com os resultados verificou-se entre as linhagens de *Candida* analisadas que 26 pertenciam à espécie *C. albicans* (83,8%) e 05 identificadas como *Candida* não-albicans (16,12%), entre essas, 03 de *C. tropicalis* (9,6%), 01 *C. glabrata* (3,2%) e 01 de *C. guilliermondii* (3,2%). Todas as crianças coinfectadas eram colonizadas com pelo menos uma linhagem de *C. albicans*, entre as quais foram detectados os genótipos A e B, sendo que o genótipo A foi mais frequente nas crianças com histórico de cárie, ocorrendo em 77% delas, enquanto que o genótipo B foi mais frequente nas crianças sem histórico da doença (87,5%). As espécies não-albicans, principalmente a *C. tropicalis* estavam associadas à microbiotas cariogênicas, sugerindo que essas espécies podem potencializar a virulência de *Streptococcus mutans*, aumentando potencialmente o risco da doença. Ambos os micro-organismos avaliados apresentaram variação na concentração de células aderidas durante a formação do biofilme *in vitro*. Entretanto verificou-se uma variação maior da capacidade de formação de biofilme *in vitro* entre os isolados de *S. mutans* procedentes de crianças coinfectadas em relação ao grupo de isolados procedentes de crianças não coinfectadas. Os isolados de *S. mutans* geneticamente diferentes variavam quanto ao padrão fenotípico da aderência, apresentaram diversidade a qual pôde ser correlacionada ao histórico da doença cárie e padrão de aderência *in vitro*. Além disso, verificou-se que o padrão de aderência pode ser modificado em função da associação com as leveduras do gênero *Candida*. As imagens pela técnica de microscopia de fluorescência confocal e por microscopia eletrônica de varredura (MEV) confirmaram a maior expressão de exopolissacarídeos na matriz do biofilme formado pela associação de *S. mutans* com *C. albicans* confirmando a potencialização da virulência de *S. mutans* nos biofilmes associados com os dois micro-organismos. A multicolonização, genótipos e distribuição das espécies de *Candida* encontradas parecem ter uma relação expressiva com o desenvolvimento da cárie dental, sendo que, indivíduos colonizados pela espécie *C. tropicalis* apresentaram maior incidência da doença.

Palavras-chave: Biofilme. *Candida albicans*. *Streptococcus mutans*.

## ABSTRACT

The present study evaluated *Streptococcus mutans* and *Candida* spp. isolates, regarding the ability of biofilm formation *in vitro*, molecular profile and the interaction of these microorganisms coming from saliva and dental plaque of children from different backgrounds caries. From samples of saliva and plaque of 38 patients were obtained 83 isolates of *S. mutans* and 31 isolates of *Candida* species, of which only 12 (31.5%) individuals were multicolonized. Isolates of *Candida* spp. were characterized for biofilm formation, as well as analyzed as parcial gene of D1/D2 region, ITS1-5,8S-ITS2 ribosomal DNA and evaluation of genotypic profile for ABC system. Twenty isolates of *S. mutans* were selected, twelve of them belonging to the coinfecting samples, and eight samples belonging to not coinfecting children. These were characterized as biofilm formation *in vitro* and by partial sequencing of *HtrA* and *GtfB* genes. According to the results analyzed it was found that the 26 strains belonged to *Candida* species which *C. albicans* (83.8%) and five non-albicans *Candida* (16.12% ), among these three were *C. tropicalis* (9.6%), one *C. glabrata* (3.2%) and one *C. guilliermondii* (3.2%). All coinfecting children were colonized with at least one strain of *C. albicans*, including genotypes A and B were detected, with genotype A was more frequent in children with a history of decay, occurring in 77% of them, while genotype B was more frequent in children with no history of the disease (87.5%). Non-albicans species, especially *C. tropicalis* were associated with cariogenic microbiota, suggesting that these species may enhance the virulence of *S. mutans*, potentially increasing the risk of disease. Both microorganisms evaluated showed variation in the concentration of cells attached during formation of the biofilm *in vitro*. However there was a greater capacity variation *in vitro* biofilm formation among *S. mutans* isolates coming from coinfecting children compared to the group of isolates coming from non-coinfecting children. The *Streptococcus mutans* isolates genetically different varied by phenotypic adhesion showed diversity which could be correlated to the history and pattern of caries *in vitro* adherence. Furthermore, it was found that the pattern of adhesion can be modified on the basis of association with *Candida* yeasts. The fluorescence confocal microscopy images and scanning electron microscopy (SEM) confirmed the increased expression of exopolysaccharides in the biofilm formed by the association of *S. mutans* with *C. albicans* confirming the enhancement of *S. mutans* virulence in biofilm associated with both microorganisms. The multicolonization, serotypes and distribution of *Candida* species seem to have found a significant relationship with the development of dental caries, with that individuals colonized by the species *C. tropicalis* had a higher incidence of the disease.

Key-words: Biofilms. *Candida albicans*. *Streptococcus mutans*.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	REPRESENTAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	20
FIGURA 2-	REPRESENTAÇÃO DO SISTEMA <i>QUORUM SENSING</i> .....	22
FIGURA 3-	ÁRVORE FILOGENÉTICA DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA BASEADA NO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS1/ITS2 DO GENE <i>rDNA</i> , CONSTRUÍDA COM 1000 REPETIÇÕES DE BOOTSTRAP, USANDO O MODELO EVOLUTIVO KIMURA 2 PARÂMETROS.....	70
FIGURA 4-	FORMAÇÃO DE BIOFILMES <i>IN VITRO</i> DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i> A 575nm.....	71
FIGURA 5-	MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DE AMOSTRAS REPRESENTATIVAS DE BIOFILMES DE ISOLADOS DE <i>C. albicans</i> .....	
FIGURA 6-	ÁRVORE FILOGENÉTICA DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA, MODELO EVOLUTIVO KIMURA 3 PARAMETROS A PARTIR DE SEQUÊNCIAS PARCIAIS DO GENE <i>Htr-A</i> DE <i>S. mutans</i> .....	73 75
FIGURA 7-	FORMAÇÃO DE BIOFILMES <i>IN VITRO</i> DE ISOLADOS DE <i>S. mutans</i> A 575nm.....	77
FIGURA 8-	ÁRVORE FILOGENÉTICA NEIGHBOR-JOINING CONSTRUÍDA A PARTIR DE SEQUÊNCIAS PARCIAIS DO GENE <i>gtf-B</i> DE <i>S.</i> <i>mutans</i> . UTILIZANDO 1000 REPETIÇÕES DE BOOTSTRAP.....	78
FIGURA 9-	MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DE AMOSTRAS REPRESENTATIVAS DE BIOFILMES <i>IN VITRO</i> DE <i>S. mutans</i> ISOLADAMENTE E EM ASSOCIAÇÃO COM <i>C. albicans</i> .....	82
FIGURA 10-	IMAGENS DE AMOSTRAS REPRESENTATIVAS DOS BIOFILMES PRODUZIDOS PELOS ISOLADOS LMICRO02-SM DE <i>S. mutans</i> e LMICRO530 DE <i>C. albicans</i> .....	85
FIGURA 11-	IMAGENS REPRESENTATIVAS, EM MÁXIMA PROJEÇÃO, DOS	

	BIOFILMES PRODUZIDOS PELOS ISOLADOS LMICRO59-SM DE <i>S. mutans</i> E LMICRO512 DE <i>C. albicans</i> ISOLADAMENTE E ASSOCIADOS.....	87
FIGURA 12-	IMAGENS REPRESENTATIVAS COMPARATIVAS DA ESPESSURA DE PRODUÇÃO DE EPS DE BIOFILMES DE <i>S.mutans</i> ISOLADAMENTE E ASSOCIADO À <i>C. albicans</i> .....	87

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	PRINCIPAIS FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>S. mutans</i> .....	33
TABELA 2-	PRINCIPAIS FATORES DE VIRULÊNCIA DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i> .....	42
TABELA 3-	LINHAGENS REFERÊNCIAS UTILIZADAS NESTE ESTUDO.....	49
TABELA 4-	CARACTERÍSTICAS DIFERENCIAIS DAS ESPÉCIES DE <i>Streptococcus</i> DO GRUPO MUTANS, BASEADO EM PROVAS BIOQUÍMICAS E DE SENSIBILIDADE À BACITRACINA.....	55
TABELA 5-	PRIMERS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Candida</i> .....	58
TABELA 6-	PRIMERS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE <i>Streptococcus mutans</i> .....	59
TABELA 7-	ISOLADOS DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i> OBTIDAS A PARTIR DE AMOSTRAS SALIVARES E DE BIOFILME DENTAL....	64
TABELA 8-	DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DAS CRIANÇAS COINFECTADAS POR LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i> .....	67
TABELA 9-	ISOLADOS DE <i>S. mutans</i> OBTIDOS A PARTIR DE AMOSTRAS SALIVARES E DE BIOFILME DENTAL DE CRIANÇAS MORADORAS NA CIDADE DE CURITIBA, PARANÁ, BRASIL.....	74
TABELA 10-	DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA DOENÇA CÁRIE E PRODUÇÃO DE BIOFILME <i>in vitro</i> DOS ISOLADOS DE <i>S. mutans</i> OBTIDOS DE CRIANÇAS COINFECTADAS E NÃO COINFECTADAS COM LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i> .....	76

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	-	Adenosina Difosfato
ALS	-	Agglutinin-Like Sequence
AMS	-	Ágar Mitis Salivarius
AMSB	-	Ágar Mitis Salivarius Bacitracina
ANOVA	-	Análise de Variância
BHI	-	Brain Heart Infusion
Ceo-d	-	Dentes Decíduos Cariados, Perdidos e Obturados
CIA	-	Clorofórmio-álcool isoamílico
CPO-D	-	Dentes Permanentes Cariados, Perdidos e Obturados
CTAB	-	Cetyl trimethylammonium bromide
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
DNase	-	Desoxirribonuclease
DO	-	Densidade Óptica
ECM	-	Matriz Extracelular
EPS	-	Exopolissacarídeos
Gbps	-	Glucan-Binding Proteins
GPI	-	Glicosilfosfatidilinositol
GTFs	-	Glicosiltransferases
IGS	-	Sequência Espaçadora Intergênica
ITS	-	Internal Transcript Spacer
kDa	-	Kilodalton
LIPs	-	Família de Genes Lipase
MEV	-	Microscopia Eletrônica de Varredura
nm	-	Nanometro
ORF	-	Open Reading Frame
PB	-	Pares de Bases
PBS	-	Phosphate buffered saline (Tampão Fosfato Salino)
PCR	-	Reação em Cadeia de Polimerase

PIC	-	Polissacarídeos Intracelulares
Rdna	-	DNA ribossomal
RNA	-	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	-	Reação da Transcriptase Reversa
Sap	-	Aspartil Proteases

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
3.1	BIOFILMES .....	19
3.1.1	Metodologias para produção de biofilmes <i>in vitro</i> .....	23
3.1.2	Uso da Microscopia de Fluorescência Confocal para análise de biofilmes.....	25
3.2	<i>Streptococcus mutans</i> .....	26
3.2.1	Formação de biofilmes por <i>Streptococcus mutans</i> .....	27
3.2.2	Mecanismos de virulência em <i>Streptococcus mutans</i> .....	29
3.2.3	Caracterização Molecular de <i>Streptococcus mutans</i> .....	33
3.3	LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i> .....	35
3.3.1	Formação de biofilmes por leveduras do gênero <i>Candida</i> .....	38
3.3.2	Mecanismos de virulência em leveduras do gênero <i>Candida</i> .....	40
3.3.3	Caracterização molecular de leveduras do gênero <i>Candida</i> .....	43
3.4	INTERAÇÃO ENTRE <i>Streptococcus mutans</i> E <i>Candida albicans</i> NA FORMAÇÃO DE BIOFILME .....	46
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	49
4.1	LINHAGENS UTILIZADAS .....	49
4.2	CASUÍSTICA .....	51
4.3	EXAME CLÍNICO .....	51
4.4	COLETAS DAS AMOSTRAS CLÍNICAS .....	52
4.5	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i> .....	52
4.6	ISOLAMENTO e IDENTIFICAÇÃO <i>Streptococcus mutans</i> .....	53
4.6.1	METODOLOGIA DAS PROVAS BIOQUÍMICAS REALIZADAS PARA	

	IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DE <i>S. mutans</i> (HOLT <i>et al.</i> 1994).....	54
4.6.1.1	PROVA DA CATALASE.....	54
4.6.1.2	PROVA DA FERMENTAÇÃO DO SORBITOL E MANITOL.....	54
4.6.1.3	PROVA DA HIDRÓLISE DA ESCULINA.....	54
4.6.1.4	PROVA DA HIDRÓLISE DA ARGININA.....	54
4.7	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR .....	55
4.7.1	Extração de DNA.....	55
4.7.2	Caracterização molecular de leveduras do gênero <i>Candida</i> .....	56
4.7.2.1	Genotipagem de <i>Candida albicans</i> pelo sistema ABC.....	56
4.7.2.2	Ribotipagem e Sequenciamento.....	57
4.7.3	Caracterização molecular de <i>Streptococcus mutans</i> .....	58
4.7.4	Alinhamento e construção filogenética .....	59
4.8	PRODUÇÃO DE BIOFILME <i>in vitro</i> .....	60
4.8.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	61
4.8.2	Microscopia de Fluorescência Confocal.....	61
4.8.3	Análise estatística .....	62
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	63
5.1	LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i> : ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E PRODUÇÃO DE BIOFILME <i>IN VITRO</i> .....	63
5.2	ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E PRODUÇÃO DE BIOFILME <i>IN VITRO</i> POR <i>Streptococcus mutans</i> .....	73
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	89
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	90
	<b>APÊNDICES</b> .....	106
	<b>ANEXOS</b> .....	123

## 1 INTRODUÇÃO

A bactéria *S. mutans* tem seu nicho preferencial nas superfícies lisas dos dentes, onde se mantem sustentada pela estrutura do biofilme dental. Entre os principais fatores de virulência desta bactéria estão a habilidade de aderência e sobrevivência em ambientes de trocas rápidas e extremas de pH, em especial sua tolerância em ambientes ácidos, proporcionando-lhe uma vantagem seletiva frente a outros micro-organismos da microbiota bucal (BANAS, 2004; KURAMITSU, 1993; ABRANCHES; LEMOS, 2012).

A síntese de polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose pela ação das enzimas glicosiltransferases (GTFs) em *S. mutans* é reconhecida como importante fator de virulência para indução da cárie dental em humanos. A partir da hidrólise da sacarose em glucose e frutose, essas enzimas unem as unidades de glucose entre si por meio de ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1-6) e  $\alpha$ -(1-3), sintetizando polissacarídeos extracelulares denominados glucanos (LOESCHE, 1986; KURAMITSU, 1993; GRÖNROOS, 2000).

Esses exopolissacarídeos (EPS) ligam-se às superfícies dos dentes sobre uma camada de glicoproteínas salivares, a “película adquirida” (KOHLEER; KRASSE, 1990). Em seguida, o aumento de EPS origina sítios de ligações que promovem o acúmulo de outros micro-organismos, inclusive podendo convertê-los em produtores de glucanos, desenvolvendo assim o biofilme dental. (BOWEN; KOO, 2011; GREGOIRE *et al.*, 2011).

Outros fatores podem influenciar no padrão de colonização e virulência do biofilme como, por exemplo, a presença do amido na dieta do hospedeiro. O amido é hidrolisado pela ação das  $\alpha$ -amilases salivares em moléculas de maltose, maltodextrina e outros oligossacarídeos, alguns dos quais podem ser aceptores durante a síntese de glucanos pelas GTF-s. Os oligossacarídeos decorrentes do amido hidrolisado, adsorvidos pelas GTFs em sua superfície, ligam-se à hidroxiapatita recoberta por saliva, promovendo, na presença da sacarose, a síntese de glucanos estruturalmente diferenciados (KLEIN *et al.*, 2009; BOWEN; KOO, 2011).



Além disso, maltose e maltodextrinas podem ser catabolizadas por *S. mutans* contribuindo para o aumento da acidificação do meio desencadeando respostas adaptativas específicas ao nível de transcrição, resultando em um biofilme com maior virulência (KLEIN *et al.*, 2009; BOWEN; KOO, 2011).

A presença do amido na dieta, associada à sacarose tem sido demonstrada como fator de aumento da virulência do biofilme formado por *S. mutans*, pela incorporação de oligossacarídeos, resultantes do metabolismo do amido durante a síntese de glucanos pelas enzimas GTFs, alterando a estrutura da matriz extracelular (ECM) no biofilme e a modulação da expressão de genes envolvidos na síntese de exopolissacarídeos (VACCA-SMITH; BOWEN, 2000; KLEIN *et al.*, 2009).

Na complexidade do biofilme dental alguns micro-organismos se associam à bactéria *S. mutans* beneficiando-se dessa organização, entre esses, as leveduras do gênero *Candida*, especialmente *C. albicans* que frequentemente coloniza a microbiota bucal como organismo sapróbio, acidúrico e de natureza oportunista, potencialmente formadora de biofilme (NIKAWA *et al.*, 2003). Os biofilmes bacterianos e fúngicos compartilham muitas características, como a adesão inicial de microcolônias, que são responsáveis pela síntese de exopolímeros, formando uma matriz dinâmica de crescimento constante e lento. Dessa forma, esses micro-organismos são protegidos do sistema imune do hospedeiro (LAFLEUR, 2008).

Os biofilmes formados pela levedura *C. albicans* são constituídos por uma ECM composta de proteínas, polissacarídeos, células do hospedeiro e células da levedura de morfologia variada, tais como leveduriformes, pseudo-hifas e hifas verdadeiras. O mecanismo de aderência e formação de biofilme por *C. albicans* envolve, entre outros, a participação de adesinas e a secreção de enzimas hidrolíticas como fosfolipases, proteases e hemolisinas (MUKHERJEE *et al.*, 2005).

A associação entre *S. mutans* e *C. albicans* foi evidenciada por Branting, Sund e Linder (1989), que observaram a coagregação dos dois micro-organismos em superfície acrílica quando incubadas em presença de sacarose.

Entre os principais mecanismos de virulência dessas leveduras, estão a versatilidade de adaptação ao meio e a formação de biofilmes pela capacidade de adesão em sítios variados (NIKAWA *et al.*, 2003). Nikawa *et al.* (1998) investigaram o efeito da saliva e do soro na colonização de hidroxiapatita, mineral constituinte do esmalte dentário, e concluíram que a levedura *C. albicans* era capaz de colonizar essa estrutura, sugerindo essa associação no biofilme dental.

Barbieri *et al.* (2007) estudando biofilmes *in vitro* de *C. albicans* e *S. mutans* com posterior análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), sugeriram que a célula da levedura poderia servir como suporte de aderência para *S. mutans* e que a presença e persistência de *C. albicans* nos biofilmes bucais também poderiam ser um fator de aumento da colonização por *S. mutans*. Diversos autores tem relatado evidências à respeito desta associação (BROGDEN, 2008; RAJA *et al.*, 2010, VÍLCHEZ *et al.*, 2010, GREGOIRE *et al.*, 2011).

A presença de *C. albicans* em lesões cariosas tem sido demonstrada, assim como a capacidade de invasão de tecidos e materiais artificiais no meio bucal como, por exemplo, o acrílico utilizado em muitos tipos de próteses e dispositivos ortodônticos (CANNON *et al.*, 1995; SEN; KAMRAN; LARZ, 1997; AKDENIZ *et al.*, 2002; NIKAWA *et al.*, 2003; CARRETO *et al.*, 2007;).

Nesse contexto, a proposta deste trabalho visa investigar padrões de expressão de biofilmes *in vitro* de leveduras do gênero *Candida* e *S. mutans*, correlacionando suas diferentes expressões com marcadores moleculares e epidemiológicos trazendo mais informações sobre essas interações em amostras clínicas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Diferenciar isolados de *S. mutans* e espécies do gênero *Candida*, procedentes de amostras de saliva e biofilme dental quanto à capacidade de formação de biofilme *in vitro*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar por meio de marcadores morfológicos, fisiológicos e moleculares, isolados de *Streptococcus mutans* e de espécies do gênero *Candida* obtidos a partir de amostras salivares e de biofilme dental de crianças com diferentes históricos de cárie;
- Caracterizar os padrões de formação de biofilme *in vitro* e a interação de *S. mutans* com os isolados de diferentes espécies do gênero *Candida* por meio de microscopia de fluorescência confocal, microscopia eletrônica de varredura e determinação do número de células aderidas *in vitro*;
- Identificar a relação entre a variabilidade genética dos isolados de leveduras do gênero *Candida* e *S. mutans* e os diferentes padrões de expressão na formação de biofilme *in vitro*.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

A microbiota bucal é um complexo ecossistema no qual são encontradas mais de 500 espécies de micro-organismos colonizando diferentes nichos. Nesse ecossistema fatores imunológicos do hospedeiro, dieta, padrão de higiene, fluxo salivar, componentes salivares, entre outras variáveis, criam um ambiente equilibrado que atua como uma barreira contra a colonização de potenciais patógenos além de impedir a proliferação de micro-organismos oportunistas. Portanto, a microbiota bucal não cariogênica constitui um componente biótico de um ecossistema compatível com a saúde (HAMADA; SLADE, 1980; CAUFIELD; CUTTER; DESANAYAKE, 1993).

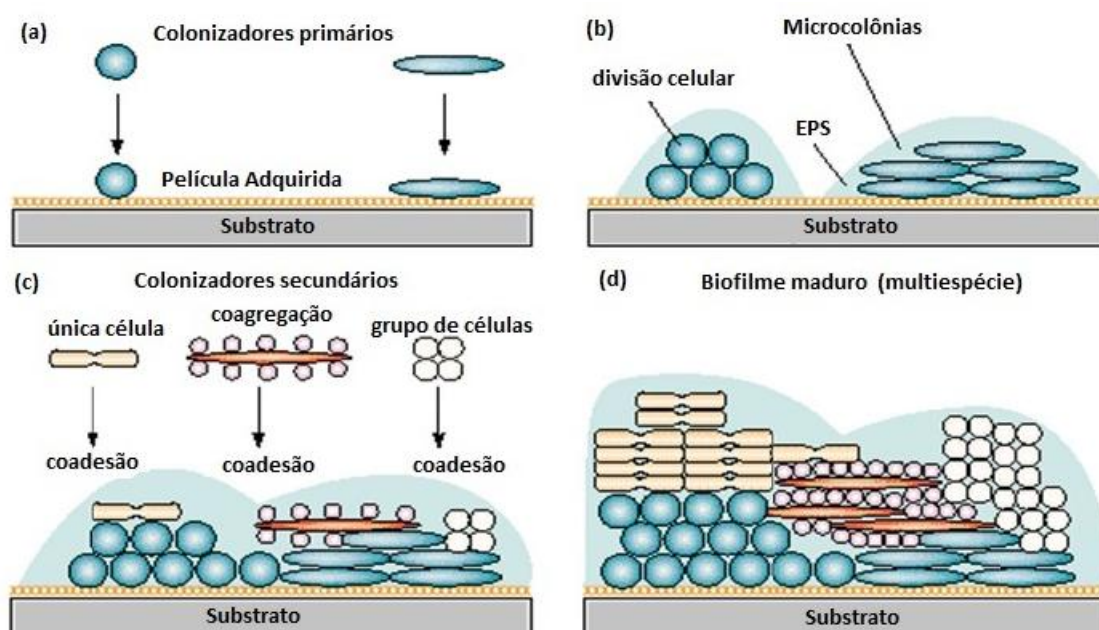
#### 3.1 BIOFILMES

Os biofilmes são complexos ecossistemas microbianos, formados por populações desenvolvidas a partir de uma única, ou múltiplas espécies, sendo encontrados em uma variedade de superfícies bióticas ou abióticas (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000). São caracterizados como uma comunidade microbiana sésil, constituída por células que estão irreversivelmente ligadas a um substrato, ou umas às outras por meio de uma interface, incorporadas numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares e exibem diferentes fenótipos dependendo do ambiente, da taxa de crescimento e da transcrição de genes (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Geralmente, a dinâmica da formação dos biofilmes ocorre em etapas coordenadas. A figura 1 ilustra as etapas de formação e desenvolvimento dos biofilmes. Inicialmente, organismos denominados colonizadores primários, aderem a uma superfície, geralmente contendo proteínas ou outros compostos orgânicos (FIGURA 1A). As células aderidas passam a se desenvolver, originando microcolônias que sintetizam uma matriz exopolissacarídica (ECM), a qual atua como um substrato para a associação de micro-organismos denominados colonizadores secundários (FIGURA 1B). Estes colonizadores secundários podem se aderir diretamente aos primários, ou promoverem a formação de coagregados

com outros micro-organismos e então se aderirem aos primários (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000) como mostra a figura 1C.

A maioria dos biofilmes exhibe certa heterogeneidade, com conjuntos de agregados celulares distribuídos ao longo da matriz exopolissacarídica (microcolônias), que exibem densidades variáveis, originando aberturas e canais por onde circulam nutrientes, água e troca de metabólitos (DONLAN; COSTERTON, 2002).



**FIGURA 1- REPRESENTAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME**  
 FONTE: ADAPTADO DE RICKARD *et al.*, 2003

NOTA: **A-** COLONIZAÇÃO PRIMÁRIA; **B-** CRESCIMENTO, PRODUÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO (EPS); **C-** COADESÃO DE CÉLULAS INDIVIDUAIS, COAGREGADAS, ORIGINANDO UM BIOFILME JOVEM; **D-** MATURAÇÃO E FORMAÇÃO DE MOSAICOS CLONAIIS NO BIOFILME MADURO.

Durante a maturação dos biofilmes, em determinados momentos, micro-organismos são liberados para que possam vir a colonizar novos ambientes. À medida que o processo se desenvolve, a complexidade e a diversidade da comunidade aumentam (FIGURA 1D). A sucessão encerra quando não há nichos disponíveis para novas populações, este estágio recebe o nome de comunidade clímax e embora seja uma etapa relativamente estável, não é um processo estático e sim dinâmico, com interações constantes com o hospedeiro e entre os micro-organismos na competição pela sobrevivência (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

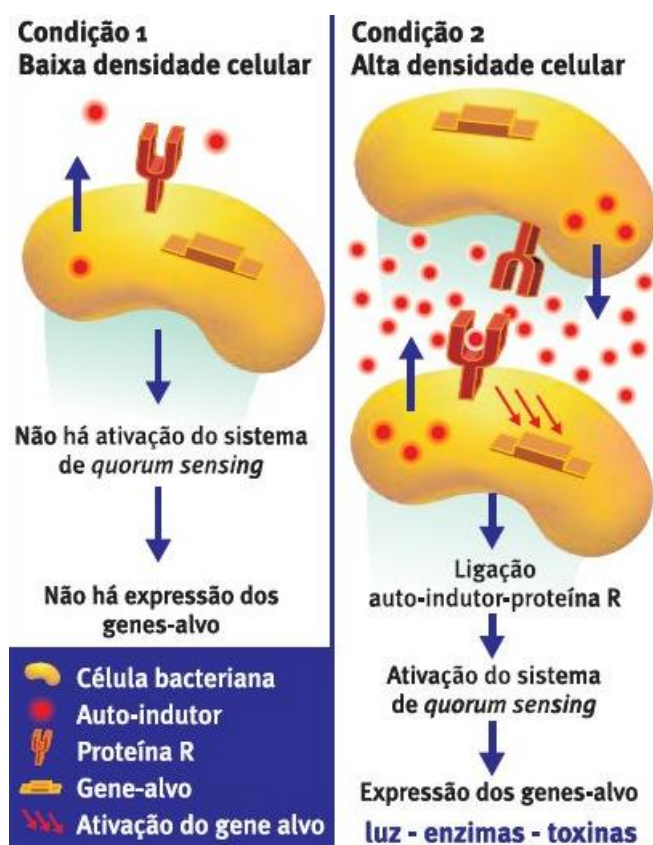
A matriz extracelular do biofilme pode sofrer variações em sua composição e estrutura dependendo dos constituintes microbianos, do ambiente e do tempo de vida do biofilme, esta estrutura fornece estabilidade mecânica ao biofilme, facilita sua adesão às superfícies e forma uma rede de polímeros harmônica e tridimensional, que interliga e imobiliza transitoriamente as células do biofilme. No biofilme os micro-organismos podem tolerar altas concentrações de agentes antimicrobianos e uma variedade de condições adversas, quando comparados com sua forma planctônica (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999).

Além dos exopolissacarídeos (EPS), outros compostos são comumente encontrados na matriz como proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e ácidos lipoteicóicos (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

As bactérias que compõem a comunidade do biofilme apresentam mecanismos reguladores, determinados por genes estimulados por diversos fatores, tendo como resultado os diferentes processos metabólicos das células do biofilme, maximizando assim a utilização dos substratos (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Um exemplo dessa regulação é o sistema *quorum sensing*, caracterizado pela regulação da expressão gênica, refletindo em resposta diretamente relacionada à densidade populacional de células no biofilme (FIGURA 2).

A detecção de uma concentração celular estimuladora de um limiar mínimo para a ativação de autoindutores conduz a uma alteração na expressão de genes. As células bacterianas produzem e liberam sinais químicos moleculares que desencadeiam alterações na expressão de proteínas que coordenam diferentes arranjos fisiológicos e estruturais no biofilme. Essa sinalização permite a comunicação intercelular na comunidade do biofilme como um todo. Esses processos incluem simbiose, virulência, competência, conjugação, produção de antibióticos, motilidade, esporulação e a própria formação de biofilmes (MILLER; BASSLER, 2001).

As interações que permitem a agregação de diferentes espécies, ou mesmo gêneros microbianos em um biofilme, geralmente envolvem a participação de adesinas (moléculas de adesão presentes em fímbrias ou dispersas ao longo da superfície celular), que reconhecem receptores específicos na superfície de outras células, ou em diversos tipos de substratos (STOODLEY *et al.*, 2002)



**FIGURA 2-** REPRESENTAÇÃO DO SISTEMA *QUORUM SENSING*

FONTE: Antunes L C., 2003.

NOTA: OS AUTOINDUTORES QUANDO EM CONCENTRAÇÃO ELEVADA, LIGAM-SE ÀS MOLÉCULAS RECEPTORAS QUE ATUAM COMO REGULADORES DA EXPRESSÃO DE GENES ESPECÍFICOS.

Os biofilmes são ambientes ideais para o desenvolvimento de relações simbióticas, onde dois tipos de organismos metabolicamente distintos dependem um do outro para utilizarem certos substratos na produção de energia (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Os recentes avanços no estudo dessa sinalização indicam que a comunicação célula-célula via autoindutores ocorre dentro e entre espécies bacterianas e também podem induzir respostas do hospedeiro (STOODLEY *et al.*, 2002).

Embora a natureza dos sinais químicos, os mecanismos de retransmissão de sinais e os genes alvo controlados por sistemas de *quorum sensing* sejam diferentes entre os micro-organismos, a capacidade de comunicação entre as células permite coordenar a expressão gênica e, por conseguinte, o comportamento da comunidade inteira (MILLER; BASSLER, 2001).

Segundo Miller e Bassler (2001), esse processo outorga às bactérias

algumas das qualidades de organismos superiores. Ainda segundo esses autores, a evolução dos sistemas de *quorum sensing* em bactérias poderia ter sido um dos primeiros passos no desenvolvimento da multicelularidade.

### 3.1.1 Metodologias para produção de biofilmes *in vitro*

O desenvolvimento de metodologias para o estudo de biofilmes vem permitindo o avanço no conhecimento de populações de micro-organismos em sua forma sésil, demonstrando diferenças fisiológicas e moleculares desses micro-organismos quando comparados com sua forma planctônica. Estudos sugerem que as comunidades de micro-organismos ligadas a uma superfície, possuam um fenótipo próprio de acordo com o ambiente e associações na comunidade do biofilme (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000; LEMOS; ABRANCHES; BURNE, 2005; STEWART; FRANKLIN, 2008).

Diversos modelos para estudo de formação de biofilmes que possam mimetizar seu comportamento natural vêm sendo desenvolvidos. Embora longe de uma compreensão completa dos múltiplos elementos que controlam as interações dinâmicas entre o hospedeiro e biofilmes, estratégias promissoras têm sido aperfeiçoadas para essa finalidade (COENYE; NELIS, 2010).

Segundo Lemos *et al.* (2010), modelos simplificados de biofilmes *in vitro* têm sido fundamentais para abordar questões básicas sobre sua formação, fisiologia e arquitetura. Eles oferecem uma série de vantagens, tais como baixo custo, execução relativamente fácil e alto rendimento. Eles geralmente mimetizam as características de biofilmes naturais como a produção e liberação de matriz extracelular, diferentes gradientes de nutrientes, produção de gases e produtos de metabolismo, alterações de pH e tensão de oxigênio assim como as densidades celulares.

Entre os diferentes modelos de biofilmes *in vitro* estão os modelos fechados ou estáticos, onde os nutrientes e a manipulação da tensão de oxigênio são limitados. Isso inclui alguns dos modelos mais populares e bem sucedidos, como o de microplacas (CHRISTENSEN *et al.*, 1985; STEPANOVIC *et al.*, 2007). Além disso, esses modelos possibilitam a quantificação direta e rápida da massa de biofilme (através do uso de corantes, como cristal violeta, safranina e vermelho do



congo) ou de células viáveis, pela redução de compostos de tetrazólio (MOSSMAN, 1983).

Os modelos de sistemas abertos ou dinâmicos são aqueles nos quais o princípio é o de culturas contínuas, onde os nutrientes são constantemente renovados e fornecidos pela adição periódica e controlada de meio de cultura fresco através de equipamentos que proporcionam fluxo contínuo e controle da tensão de O<sub>2</sub>. Estes métodos permitem maior controle de parâmetros e, por conseguinte, têm sido extensivamente utilizados para estudar a resistência física e química de biofilmes. No entanto, para sua utilização há necessidade de equipamentos e manejo especializados (COENYE; NELIS, 2010).

Os biofilmes microcosmos são modelos mais sofisticados que visam simular detalhadamente condições *in situ*. Eles geralmente incluem várias espécies bacterianas e utilizam materiais e compostos removidos do ambiente estudado, por exemplo, a adição de hidroxiapatita de esmalte e de saliva para modelar biofilmes dentais, ou o revestimento de superfícies abióticas com células humanas a fim de simular uma situação *in vivo* (RUDNEY *et al.*, 2012). Segundo Lebeaux *et al.* (2013), teoricamente, ambos os sistemas, abertos e fechados poderiam ser transformados em microcosmos. Os modelos de microcosmos podem incluir mais parâmetros ambientais e levar em consideração a complexidade e heterogeneidade dos ambientes naturais (RUDNEY *et al.*, 2012).

Embora muitas vezes considerados simplistas, os modelos *in vitro* têm contribuído grandemente para o conhecimento atual da fisiologia dos biofilmes. Ainda são largamente utilizados para estudar o papel de diferentes genes envolvidos na formação de biofilme e de processos de regulação, bem como outras finalidades, tais como rastreamento de bibliotecas de agentes antimicrobianos (LE MOS *et al.*, 2010; LEBEAUX *et al.*, 2013).

Os modelos *ex-vivo* de produção de biofilmes são metodologias intermediárias entre os modelos *in vitro* e *in vivo*, nestes casos tecidos ou órgãos são extraídos a partir de um organismo e colocados num ambiente artificial para posterior análise e experimentação. Podem ser particularmente úteis para analisar a progressão da colonização bacteriana de um determinado órgão ou tecido, tal como o epitélio traqueal, a mucosa vaginal, rins ou dentes (HARRIOTT *et al.*, 2010). Esses modelos também podem ser utilizados para avaliar diferentes janelas de tempo para o tratamento eficaz de infecções decorrentes de biofilmes (WOLCOTT *et al.*, 2010).

Xiao *et al.* (2012) exploraram os mecanismos pelos quais *S. mutans* modula uma arquitetura tridimensional da ECM dos biofilmes, utilizando um modelo de aderência *in vitro* com discos de hidroxiapatita e confirmaram a importância das enzimas glicosiltransferases (GTFs) nesse processo, mediada pelos genes *GtfB* e *GtfC* considerando esse um fator essencial para a virulência e cariogenicidade do biofilme.

Lemos *et al.* (2010) descreveram vários modelos de estudo de biofilmes *in vitro* que podem ser utilizados para o estudo da fisiologia de estreptococos bucais e adaptados para outras espécies de micro-organismos. Os modelos descritos utilizam produção de múltiplos biofilmes no mesmo ensaio, permitindo maior número de reproduções de maneira mais ágil, podendo ser utilizados em estudos de compostos para inibição de aderência, expressão proteica e morfologia.

### 3.1.2 Uso da Microscopia de Fluorescência Confocal para análise de biofilmes

O entendimento da relação entre a estrutura e atividade de diferentes biofilmes e os fatores que fisicamente moldam sua organização são fundamentais para seu controle em ambientes industriais ou clínicos. A interpretação da estrutura e comportamento de vários modelos de biofilmes pode acrescentar informações sobre metabolismo, expressão gênica, coagregação entre organismos, entre outros (STOODLEY *et al.*, 1999).

Métodos de microscopia que permitam o exame não invasivo de biofilmes vivos e no seu estado hidratado são ferramentas valiosas de investigação e análise dessas estruturas. A microscopia de fluorescência confocal (NEU; LAWRENCE, 1999) permite a possibilidade de efetuar secções ópticas em diferentes profundidades, com aquisição de imagens tridimensionais da estrutura avaliada como evidenciado em trabalhos como Klein *et al.* (2009); Koo *et al.* (2010); Xiao *et al.* (2012), entre outros.

A microscopia de fluorescência confocal permite ainda a análise de imagens em canais múltiplos com uso de várias sondas fluorescentes, de modo a obter informação espacial da diversidade funcional do biofilme (XAVIER *et al.*, 2003). Esta técnica é baseada no princípio que o dextrano marcado por fluorescência, funciona como iniciador e receptor para as enzimas glicosiltransferases (GTFs),

particularmente GTF-B. O marcador é incorporado ao glucano recém-formado pela enzima, durante a síntese da matriz EPS no desenvolvimento dos biofilmes sem, contudo marcar as células (Klein *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2012).

As informações adquiridas pela técnica de microscopia de fluorescência confocal podem ser processadas digitalmente e utilizadas para a obtenção da informação visual ou estatística com uso de programas computacionais que tratam as informações obtidas, uma vez que o desenvolvimento de biofilmes é um processo aleatório e experimentos independentes nunca originam cópias estruturais exatas, mesmo que todas as condições experimentais sejam mantidas (HEYDORN *et al.*, 2000).

Um método sugerido por Heydorn *et al.* (2000) inclui a análise de variância na dependência de propriedades estruturais tais como espessura média do biofilme, condições de cultivo, linhagem bacteriana, metabolismo de substratos, entre outros.

As técnicas e modernização de equipamentos em microscopia de fluorescência confocal têm permitido o avanço no estudo de biofilmes, pois permitem efetuar estudos de sensibilidade e de viabilidade celular, sem que para tal seja necessário haver destruição da sua estrutura (JEFFERSON; GOLDMANN; PIER, 2005; KROM *et al.*, 2007).

### 3.2 *Streptococcus mutans*

A bactéria *Streptococcus mutans* pertence ao grupo viridans, é  $\alpha$ -hemolítica e comumente coloniza as superfícies lisas dos dentes, sendo o principal agente etiológico da cárie dental. Também pode ser isolada de abscessos dentários e endocardites (HAMADA; SLADE, 1980).

Os estreptococos mutans foram originariamente descritos como uma única espécie, *S. mutans*, divididos em 08 subgrupos em função da especificidade sorológica dos antígenos de carboidratos da parede celular (a-h). Posteriormente esses diferentes sorotipos foram classificados em grupos compostos por espécies independentes: grupo mutans (os isolados de origem humana *S. mutans* e *S. sobrinus*, e algumas espécies de origem animal como *S. rattis*, *S. cricetti*, *S. ferus*, *S. macacae*, *S. downei*; grupo salivarius (*S. salivarius* e *S. vestibularis*); grupo mitis (*S. mitis* e *S. oralis*) e grupo sanguis (*S. sanguis*, *S. gordonii*, *S. parasanguis* e

*S. crista*) (NAKANO *et al.*, 2004). Dentre estes, *S. sobrinus* contribui com a progressão das lesões de cárie iniciadas por *S. mutans* (KÖHLER; BIRKHED; OLSSON, 1995).

A identificação da bactéria *S. mutans* foi descrita por Clarke (1924), isolada de lesões cariosas de crianças inglesas, e recebeu a denominação de estreptococos “mutante” por possuir a morfologia mais ovalada que outros estreptococos (HAMADA; SLADE, 1980).

Os *S. mutans* são cocos Gram-positivos, com morfologia ovalada agrupam-se em cadeias e suas células medem aproximadamente 0,5 a 0,75µm de diâmetro. Requerem meios nutricionalmente ricos para seu desenvolvimento e temperatura média de 37°C (GRÖNROOS; ALALUUSUA, 2000).

O meio de cultura mais frequentemente utilizado para o isolamento primário de *S. mutans* é o Ágar Mitis Salivarius (AMS) com adição de sacarose, bacitracina e telurito de potássio (GOLD; JORDAN; VAN HOUTE, 1973). Em AMS formam colônias pequenas, com bordas irregulares, fortemente aderidas ao ágar. Com adição de sacarose ao ágar, muitas linhagens de *S. mutans* produzem colônias com cerca de 1mm de diâmetro.

A identificação presuntiva de *S. mutans* é baseada na macromorfologia em AMS, na micromorfologia, além de características de crescimento específicas quanto ao padrão enzimático e assimilação de açúcares (GRÖNROOS; ALALUUSUA, 2000; KONEMAN *et al.*, 2001).

### 3.2.1 Formação de biofilmes por *Streptococcus mutans*

A cárie dentária é uma doença relacionada à presença de biofilmes nas superfícies dos dentes, resultante da interação entre bactérias específicas, componentes salivares e carboidratos da dieta, sendo considerada a sacarose o principal substrato envolvido nesse processo, utilizado para a síntese de exopolissacarídeos (EPS) no biofilme dental (BOWEN, 2002; LEME *et al.*, 2006).

Em contrapartida, o amido é uma fonte de carboidrato fermentável, usualmente consumido simultaneamente com a sacarose. A combinação entre amido e sacarose é altamente cariogênica *in vivo* (BOWEN *et al.*, 1980,

THURNHEER *et al.*, 2008) e pode aumentar a patogenicidade de biofilmes em seres humanos (RIBEIRO *et al.*, 2005).

Klein *et al.* (2009) investigaram como o amido e a sacarose em combinação na dieta são potencialmente mais cariogênicos do que sozinhos e em associação com patógeno-hospedeiro específico, podem modular o desenvolvimento de biofilmes por *S. mutans*. Os autores demonstraram a incorporação de oligossacarídeos, decorrentes da metabolização do amido por  $\alpha$ -amilases salivares, durante a síntese de glucanos pelas GTFs em *S. mutans*. Esses oligossacarídeos podem influenciar a organização estrutural da matriz extracelular e a modulação da expressão de genes envolvidos na síntese de exopolissacarídeos aumentando o potencial de virulência de *S. mutans* nos biofilmes (VACCA-SMITH; BOWEN, 2000; KLEIN *et al.*, 2009).

A aderência da bactéria *S. mutans* à superfície dentária é precedida pela formação de uma película de glicoproteínas salivares denominada “película adquirida”. A etapa inicial de formação do biofilme dental ocorre sobre a película adquirida e requer uma forte aderência, que resista às forças de remoção do fluxo salivar e dos movimentos musculares da dinâmica mastigatória. Essas ligações envolvem interações específicas dos componentes da película com a parede celular dos micro-organismos (LOESCHE, 1986).

Numa etapa posterior, ocorre a adesão dos colonizadores primários sobre a película adquirida, essas interações acontecem de maneira inespecífica por interações de Van der Waalls, e específicas mediada por adesinas. As adesinas presentes nos colonizadores primários do biofilme possuem maior afinidade de interação com a película adquirida, além de produzirem proteases que clivam as moléculas de anticorpos. Os principais colonizadores primários dos biofilmes dentais são *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus mitis*. Nesta fase, se houver disponibilidade de sacarose poderá ocorrer a participação de *S. mutans* e *S. sobrinus* (ARENDORF; WALKER, 1980).

Em seguida acontece a fase de acúmulo, pelos colonizadores secundários, na qual uma grande diversidade de micro-organismos participa da colonização do biofilme em mecanismos de coadesão e coagregação. Entre os colonizadores secundários encontram-se *Veillonella* spp., *Actinomyces* spp., *Fusobacterium nucleatum*, entre outros. Essa comunidade de micro-organismos cria então condições para que ocorra em seguida a comunidade clímax no biofilme com a

agregação de bastonetes Gram-negativos, espiroquetas, *Actinobacillus* e *Treponema*. As leveduras do gênero *Candida* podem ser encontradas no biofilme dental coagregadas a espécies bacterianas ou aderidas diretamente à película adquirida (ARENDORF; WALKER, 1980; BAGG; SILVERWOOD, 1986; JENKINSON; LALA; SHEPHERD, 1990; CANNON; NAND; JENKINSON, 1995; NIKAWA, *et al.* 1998).

À medida que o biofilme se forma, menor a disponibilidade de O<sub>2</sub> e nutrientes nas áreas mais internas, favorecendo os micro-organismos anaeróbicos. A redução do pH, pela alta produção de ácido láctico proveniente do metabolismo da sacarose pelos micro-organismos colonizadores primários e secundários do biofilme, também desencadeia a permanência de organismos com alta tolerância ao meio ácido. Assim, uma dinâmica de reações bioquímicas vai determinando a sucessão e manutenção de micro-organismos no biofilme (NIKAWA *et al.*, 1998).

Essa sucessão coordena a composição e colonização do biofilme dental além das interações de antagonismo e mutualismo entre gêneros e espécies. É importante ressaltar que no meio bucal todo esse processo interage com o fluxo salivar, condições de higiene e nutrição do hospedeiro, consumo de sacarose na dieta e modulação da imunidade (ARENDORF; WALKER, 1980).

### 3.2.2 Mecanismos de virulência em *Streptococcus mutans*

Apesar da bactéria *S. mutans* ser considerada o principal agente etiológico da cárie dental (HAMADA; SLADE, 1980; LOESCHE, 1986), a simples presença desta bactéria na microbiota bucal nem sempre leva ao desenvolvimento de cárie, podendo estar presente não somente em populações com moderada ou alta prevalência da doença (BEIGHTON; RIPPON; THOMAS, 1987; ALALUUSUA, 1993), mas também em populações de baixa experiência de cárie ou ainda livres da sua incidência (LOESCHE, 1986; MATEE *et al.*, 1993). Demonstrando que a combinação de fatores associados à variabilidade genotípica das linhagens e condições endógenas e exógenas do hospedeiro compõe um perfil de susceptibilidade ao aparecimento de cárie (ALALUUSUA, 1993).

O potencial cariogênico de *S. mutans* está diretamente relacionado à sua habilidade de metabolizar uma ampla variedade de açúcares, especialmente a

sacarose (BOWEN; KOO, 2011). A partir da hidrólise da sacarose em glucose e frutose, as enzimas glicosiltransferases (GTFs) secretadas por *S. mutans*, *S. sobrinus* e outros estreptococos bucais do grupo mutans unem as unidades de glucose entre si por meio de ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1-6) e  $\alpha$ -(1-3), sintetizando polissacarídeos extracelulares denominados glucanos. Esses glucanos conferem à bactéria *S. mutans* a capacidade de aderir às superfícies lisas dos dentes e formar a matriz extracelular do biofilme dental (LOESCHE, 1986; KURAMITSU, 1993; GRÖNROOS, 2000).

As enzimas GTFs desempenham papéis críticos no desenvolvimento do biofilme dental, adsorvem ao esmalte dentário sintetizando glucanos, que promovem sítios para a colonização de micro-organismos e criam uma matriz insolúvel que estabiliza o biofilme dental. As GTFs também adsorvem às superfícies de outros micro-organismos bucais convertendo-os em produtores de glucanos. A bactéria *S. mutans* expressa três tipos de GTFs distintas (GTF-B, GTF-C e GTF-D), desempenhando diferentes, mas sobrepostos papéis na formação do biofilme dental. As enzimas GTF-B catalisam a síntese de glucanos insolúveis em água, também chamados de mutanos, ricos em ligações do tipo  $\alpha$ -(1-3) que proporcionam a ligação das bactérias à superfície dental, promovendo agrupamento coeso de células e aumentando a adesão do biofilme (BOWEN; KOO, 2011).

As GTF-C catalisam a síntese de glucanos com os dois tipos de ligações,  $\alpha$ -(1-3) e  $\alpha$ -(1-6). Além disso, as enzimas GTF-C parecem possuir maior afinidade pela hidroxiapatita, apresentando mais sítios de ligação a essa estrutura em relação às GTF-B ou GTF-D. Estudos *in situ* e *in vitro* mostraram que a GTF inicialmente detectada na película adquirida é a GTF-C (VENKITARAMAN *et al.*, 1995; VACCA-SMITH; BOWEN, 2000).

Já as GTF-D catalisam a síntese de glucanos com ligações  $\alpha$ -(1-6), solúveis em água, também chamados de dextranos que parecem funcionar como um reservatório extracelular de açúcares, sendo hidrolisados por outras exoenzimas, as dextranases (FUKUSHIMA; IKEDA; KURAMITSU, 1992; TAUBMAN; SMITH, 2005). A ação da GTF-D é formar polissacarídeo solúvel, rapidamente metabolizável que atua como iniciador para a atuação da GTF-B (BOWEN; KOO, 2011; GREGOIRE *et al.*, 2011).

Outros estreptococos bucais, incluindo *S. sanguis*, *S. salivarius* e possivelmente *S. gordonii*, também podem sintetizar estes polissacarídeos, mas

apenas os estreptococos do grupo mutans apresentam aumento de colonização induzido pela sacarose (VACCA-SMITH; BOWEN, 2000).

A bactéria *S. mutans* também tem a capacidade de sintetizar polissacarídeos intracelulares (PIC), que são armazenados, permitindo serem metabolizados na falta de carboidratos fermentáveis suplementados pela dieta (GRÖNROOS, 2000). Quando há açúcares em excesso, o glicogênio é utilizado como fonte de energia potencial em forma de polissacarídeo intracelular (PIC). Assim ocorre um aumento no reservatório intracelular de frutose 1,6 bifosfato e intermediários glicolíticos e inicia-se a síntese de polissacarídeos pela atuação da ADP-glicose fosforilase (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1995). Os PICs atuam removendo os intermediários glicolíticos da célula, protegendo contra metabólitos intermediários tóxicos (NISENGARD; NEWMAN, 1994).

Quando nenhum açúcar for suplementado pela dieta, os PICs são utilizados como fonte de energia e os ácidos são secretados em um mecanismo regulado pelos níveis exógenos de açúcar, onde nos baixos níveis a reserva intracelular aumenta, resultando na ativação de glicogênio fosforilase e no consumo da reserva intracelular de polissacarídeos (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1995).

Outro fator de virulência em *S. mutans* é a síntese de proteínas ligantes de glucano (Gbps - Glucan-binding proteins). Existem pelos menos quatro tipos de Gbps, a GbpA, GbpB, GbpC e GbpD. Estas proteínas presentes na parede celular de *S. mutans*, se ligam aos glucanos. Acredita-se que as Gbps sejam importantes para o acúmulo da bactéria na presença de sacarose, pois formam uma “ponte” que liga as superfícies celulares destes micro-organismos à matriz extracelular. (GRÖNROOS, 2000).

As adesinas em *S. mutans* são capazes de se ligar especificamente aos componentes da película adquirida. Assim, além das proteínas que se ligam aos glucanos (Gbps), *S. mutans* apresentam adesinas de superfície da família SpaP, intensificando a coesão desta aderência (AJDIĆ *et al.*, 2002).

Outro fator de virulência de *S. mutans* é a presença das exoenzimas frutossiltransferases (FTFs) que participa da síntese de frutanos. Os frutanos são polissacarídeos extracelulares solúveis em água formados por moléculas de frutose liberadas durante a hidrólise da sacarose. O principal papel dos frutanos na virulência da bactéria *S. mutans*, está associado ao fato de atuarem como reservatórios extracelulares de substratos, durante os períodos de escassez de



nutrientes. Nessas condições, exoenzimas denominadas frutanasas (sintetizadas por *S. mutans*) hidrolisam estes polissacarídeos, para que os monossacarídeos de frutose sejam transportados para o interior das células e possam ser metabolizados (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1995).

Destaca-se ainda entre os fatores de virulência de *S. mutans* a presença de bacteriocinas ou mutacinas, que são capazes de inibir o crescimento de outras espécies bacterianas geralmente filogeneticamente relacionadas e até mesmo outras linhagens de *S. mutans*. Pesquisas com bacteriocinotipagem vêm sendo desenvolvidas em estudos de transmissibilidade pelo perfil de produção de bacteriocinas (KAMIYA; TAIETE; GONÇALVES, 2011).

Outro mecanismo de regulação da bactéria *S. mutans* no biofilme é a clivagem proteolítica que libera proteínas e enzimas GTFs extracelulares da superfície da célula. Entre as inúmeras proteases envolvidas nesse processo encontra-se a *trypsin like serine protease* (HtrA), amplamente estudada pelo seu papel na fisiologia celular, particularmente auxiliando a bactéria na sobrevivência em ambientes de estresse ácido, oxidativo e osmótico e em temperaturas elevadas (BISWAS; BISWAS 2005; LEMOS *et al.*, 2010). Estudos indicam que as proteases HtrA têm uma função de limpeza, atuando como chaperonas, degradando proteínas deformadas, favorecendo a manutenção das proteínas produtivas e evitando as interações prejudiciais (BISWAS; BISWAS, 2005).

A tolerância ácida representa um dos principais mecanismos de sobrevivência de *S. mutans*, e está intimamente relacionado à sua virulência e a principal enzima envolvida neste processo é a ATPase que funciona como bomba de próton, a qual permite à bactéria manter o pH citoplasmático alcalino enquanto o ambiente extracelular permanece ácido. A considerável diminuição do pH foi observada na boca poucos minutos após o consumo de glicose indicando que a bactéria é rapidamente acidogênica (KLEINBERG, 2002; LEMOS, ABRANCHES; BURNE, 2005; LEMOS *et al.*, 2010). A habilidade de *S. mutans* de adaptação em ambientes extremamente ácidos confere a essa bactéria uma vantagem seletiva frente a outros micro-organismos presentes no biofilme. (BANAS, 2004; KURAMITSU, 1993). Além de gerar e tolerar ácido, *S. mutans* consegue também tolerar a exposição a rápidos e contínuos ciclos de choques ácidos. *In vivo*, o pH pode variar de neutro até valores entre pH 3,0 - pH 4,0 em menos de vinte minutos após a ingestão de carboidratos (YAMADA; KIMURA; IGARASHI, 1980; MORMANN;

MUHLEMAN, 1981; LEMOS *et al.*, 2010). A tabela 1 sumariza os principais fatores de virulência em *S. mutans*.

**TABELA 1 - PRINCIPAIS FATORES DE VIRULÊNCIA DE *S. mutans***

FATOR	FUNÇÃO	LOCALIZAÇÃO
GTF-B	Catalisam a síntese de glucanos insolúveis em água	Superfície da célula (exoenzimas)
GTF-C	Catalisam a síntese de glucanos solúveis e insolúveis em água	Superfície da célula (exoenzimas)
GTF-D	Catalisam a síntese de dextranos	Superfície da célula (exoenzimas)
PIC	Síntese de polissacarídeos intracelulares	Intracelular
Gbps	Síntese de proteínas ligantes de glucano	Superfície celular
SpaP	Adesinas de superfície à película adquirida	Superfície celular
FTF	Síntese de frutanos	Superfície celular (exoenzima)
Mutacinas	Inibição do crescimento de outras linhagens De <i>S. mutans</i> e espécies relacionadas	Superfície celular (exoenzimas)
Htr-A	Clivagem proteolítica	Superfície celular
FATPase	Tolerância ácida	Membrana celular

FONTE: ADAPTADO PELO AUTOR (2014)

NOTA: BASEADO EM BOWEN, 2000; GRÖNROOS, 2000; TAUBMAN; SMITH, 2005; LEMOS, ABRANCHES; BURNE, 2005; BISWAS; BISWAS 2005; VACCA-SMITH; LEMOS *et al.*, 2010; BOWEN; KOO, 2011).

### 3.2.3 Caracterização Molecular de *Streptococcus mutans*

Evidências sugerem que nem todas as linhagens de *S. mutans* são igualmente virulentas na promoção da cárie dental (KOHLER; KRASSE, 1990; FITZGERALD *et al.*, 1983) e as bases genéticas para a elucidação dessas diferenças vêm sendo investigadas (ARGIMON; CAUFIELD, 2011). Com o sequenciamento do genoma de *S. mutans* (linhagem UA159), concluído em 2002 pela Universidade do Alabama, foram identificados diversos genes relacionados à virulência deste organismo, como aqueles associados à produção de glucanos extracelulares, adesinas, proteases de tolerância ácida e hemolisinas. Além disso, ainda foi detectada a presença de transposons que contêm genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de antibióticos da família da gramicidina e bacitracina (AJDIC *et al.*, 2002).

O avanço nas pesquisas em genômica e proteômica vem recentemente permitindo novas abordagens. A análise de um único gene está sendo substituída por uma visão muito mais abrangente. O modelo científico atual é o de compreender

dentro de um genoma, as redes funcionais que se estabelecem entre as proteínas por eles codificadas (ARGIMON; CAUFIELD, 2011).

Análises funcionais do genoma de *S. mutans* mostram que os requisitos primários para a formação de biofilme, envolvem a integração de circuitos regulatórios genéticos com captação de sinais ambientais para alterar a expressão de fatores requisitados para adesão, interações intercelulares, e crescimento em resposta às condições ambientais durante a formação do biofilme (LEN; HARTY; JACQUES, 2004 a, b; AHN; LEMOS; BURNE, 2005; LEME *et al.*, 2006; ABRANCHES *et al.*, 2006).

Além disso, têm-se observado que diferentes linhagens de *S. mutans* possuem sequências peculiares para determinados genes, o que explicaria diferenças nas manifestações de virulência (AJDIC *et al.*, 2002; TETTELIN *et al.*, 2005). Dentro dessa perspectiva, têm sido realizados estudos associando a variabilidade genética e as características epidemiológicas, clínicas e de virulência. Por exemplo, Napimoga *et al.* (2004) avaliando a diversidade genotípica dos isolados de *S. mutans* em indivíduos livres de cárie e com atividade de cárie, observaram perfil genético diferente entre os dois grupos. Assim como, constataram que genótipos de *S. mutans* associados à alta capacidade de sintetizar glucanos insolúveis eram mais frequentes em indivíduos cárie ativos.

Alguns genes têm sido amplamente estudados para o esclarecimento do potencial cariogênico de *S. mutans*, e associados aos seus fatores de virulência (BANAS, 2004; KURAMITSU, 1993). Entre os genes estudados envolvidos na virulência dos biofilmes estão os genes que codificam a produção das enzimas GTFs. As sequências codificadoras dos genes *gtfB* e *gtfC* tem apenas 198 pb, e podem ser cotranscritas e submetidas aos mesmos mecanismos de regulação (UEDA *et al.*, 1988, HUDSON; CURTISS, 1990; WEXLER; HUDSON; BURNE, 1993; YOSHIDA; KURAMITSU, 2002).

Koo *et al.*, (2010) compararam os biofilmes *in vitro* de linhagens de *S. mutans* com mutantes induzidos para os genes *gtfs*. Os autores verificaram que os genes *gtfB* e *gtfC* são essenciais para formação da matriz exopolissacarídica do biofilme, porém quanto a *gtfB* também parece ser responsável pela formação de microcolônias. Os autores sugerem ainda que esses processos mediados pelas enzimas GTFs podem estar envolvidos na competitividade de *S. mutans*, em biofilmes formados por multiespécies de organismos nas superfícies dentais.

O gene *HtrA* também tem sido estudado para avaliar o potencial cariogênico de *S. mutans*, ele foi identificado em bactérias filogeneticamente distintas, incluindo bactérias gram-positivas, sugerindo um papel fundamental na resposta de *HtrA* ao estresse ambiental e possivelmente na patogênese (PALLEN; WREN, 1997; CLAUSEN; SOUTHAN; EHRMANN, 2002). Outros estudos sugerem que *HtrA* pode estar envolvido na biogênese de proteínas extracelulares, formação de biofilme e transformação genética (AHN; LEMOS; BURNE, 2005; BISWAS & BISWAS, 2005).

Chen *et al.* (2007) desenvolveram um conjunto de *primers* que restringe uma sequência de DNA específica para *S. mutans*. O conjunto desses *primers* Sm479F/R definem uma região diretamente associada com o gene *HtrA* e geneticamente competente em *S. mutans* como demonstrado por Ahn, Lemos e Burne (2005). Devido a esta especificidade, este conjunto de iniciadores pode ser utilizado para a identificação de *S. mutans* em amostras de biofilmes dentais ou saliva total.

### 3.3 LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*

As leveduras do gênero *Candida* pertencem ao reino *Fungi*, divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Blastomycetes*, família *Cryptococcaceae*. O gênero *Candida* é o principal entre as leveduras patogênicas, compreendendo aproximadamente 200 espécies (MCCULLOUGH; ROSS; READE, 1996).

Para o isolamento de leveduras do gênero *Candida* são utilizados diferentes meios de cultura cromogênicos, com boa capacidade de diferenciar *C. albicans* de outras espécies de interesse clínico. Esses meios tem como fundamento a alteração na cor desenvolvida pelas colônias através de indicadores de pH e fermentação de compostos específicos ou substratos cromogênicos (COOKE *et al.*, 2002; QUINDÓS *et al.*, 2001). O meio de cultura CHROMagar® tem sido utilizado para isolar e identificar presuntivamente *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (QUINDÓS *et al.*, 2001). Este meio fundamenta-se na cor desenvolvida pelas colônias através de indicadores de pH e fermentação de compostos específicos ou substratos cromógenos como por exemplo o substrato  $\beta$ -glicosaminidase (CARRILLO-MUNÓZ *et al.*, 2001). Os meios cromogênicos são rotineiramente utilizados para a identificação presuntiva de leveduras do gênero

*Candida*, reduzindo o tempo de identificação e proporcionando orientação da terapêutica (COOKE *et al.*, 2002; QUINDÓS *et al.*, 2001).

As leveduras do gênero *Candida* podem se desenvolver em morfologia leveduriforme ou em forma de hifas. Na forma de levedura seu tamanho é aproximadamente 3 a 7µm de diâmetro e as hifas em média 3 a 14µm de comprimento, são aeróbios, porém tem a capacidade de se desenvolver em ambientes microaerófilos. As colônias de leveduras do gênero *Candida* possuem cor de creme a amarelada, se desenvolvem em Agar Sabouraud em aproximadamente 3 dias. A textura das colônias pode variar de brilhante ou seca, enrugada ou lisa, brilhante ou opaca. (MCCULLOUGH; ROSS; READE, 1996).

A espécie *C. albicans* é a mais frequentemente isolada em humanos, entretanto, nas últimas décadas tem sido observado significativo aumento de outras espécies: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. utilis*, *C. norvegensis*, *C. rugosa*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. ciferrii*, *C. lipolytica*, *C. haemulonii*, *C. pulcherrima*, *C. catenulata*, *C. viswanathii* e *C. zeylanoides*. Essas e outras espécies, conhecidas como não-albicans, têm sido cada vez mais implicadas em processos infecciosos humanos (KAM; XU, 2002).

As leveduras do gênero *Candida* são micro-organismos comensais, que colonizam principalmente o trato gastrointestinal e genito-urinário, mas também podem ser isoladas de outros sítios como pele e vias respiratórias. São consideradas oportunistas podendo levar à infecções quando os mecanismos imunológicos do hospedeiro estão comprometidos ou quando ocorrem rompimentos de barreiras anatômicas como queimaduras, uso de cateteres ou cirurgias. (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

A frequência da colonização de leveduras do gênero *Candida* na microbiota bucal de diferentes grupos populacionais mostra que apenas uma parte da população é colonizada por essas leveduras (CANNON *et al.*, 1995), sugerindo que a existência de barreiras naturais na superfície das mucosas possam impedir a colonização em indivíduos não portadores. Alguns fatores parecem estar frequentemente associados à colonização pelas leveduras do gênero *Candida* como a idade, gênero, dieta, uso de medicamentos, tabagismo, condições sistêmicas e modulação imunológica (HOFFLING *et al.*, 2011).

A ocorrência de leveduras do gênero *Candida* na microbiota bucal de crianças e adultos jovens saudáveis pode variar de 5 a 70% (FOTOS; VINCENT;

HELLSTEIN, 1992; DARWAZEH; ALBASHIR, 1995; AKDENIZ *et al.*, 2002; KADIR; UYGUN; AKYUZ, 2005). Diferentes estudos mostram que essa variação pode ser explicada pela metodologia de coleta do material clínico, origem das amostras, meios de cultura, subgrupos estudados e métodos de análise (FOTOS; VINCENT; HELLSTEIN, 1992). Cerca de 80% dos isolados de leveduras do gênero *Candida* da microbiota bucal são de *C. albicans*, frequentemente seguidos das espécies *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. famata* e *C. tropicalis* (DARWAZEH; ALBASHIR, 1995; AKDENIZ *et al.*, 2002; KADIR; UYGUN; AKYUZ, 2005).

Fatores mecânicos, como o uso de próteses, aparelhos ortodônticos, chupetas e presença de lesões de cárie facilitam a colonização por leveduras do gênero *Candida*, pois alteram o ambiente bucal criando novos sítios de retenção de biofilme. Darwazeh e Al-Bashir (1995) demonstraram maior frequência de leveduras do gênero *Candida* em crianças que faziam uso de chupetas. Entretanto, Akdeniz *et al.* (2002) não encontraram diferenças significativas no isolamento de *C. albicans* associadas aos hábitos de dieta, uso de chupeta, mamadeiras e pH salivar, porém a presença de lesões de cárie foi um fator importante de aumento no isolamento das leveduras.

Kadir, Uygun e Akyuz (2005) estudaram a ocorrência de leveduras do gênero *Candida* na microbiota bucal de 300 crianças Turcas, com idades entre 0 e 12 anos dividindo-as em três grupos de acordo com a faixa etária: grupo A: 0-5 anos, com 17% de prevalência, grupo B: 6-8 anos, com 50,8% e o grupo C: 9-12 anos com 27,9%. Sendo observado que 26,3% das crianças eram colonizadas por alguma espécie de *Candida* e entre os isolados, 84,8% foram identificados como *C. albicans* e 15,8% pertenciam às espécies *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. famata* e *C. tropicalis*. Os autores enfatizaram que as crianças com dentição mista podem representar um fator de risco à colonização por *Candida*. Neste estudo também foi investigada a relação entre o aleitamento materno ou uso de mamadeira como fator local para colonização pelas leveduras, nas crianças com faixa etária 0-2 anos sendo que a prevalência de colonização por *Candida* entre as crianças amamentadas por mamadeira ou associação mamadeira/leite materno foi de 18,5%, enquanto que não foi observada colonização entre as crianças amamentadas exclusivamente com leite materno, sendo sugerido pelos autores que o leite materno possa ser um fator de proteção contra a colonização por *Candida*.

A presença de *Candida* não-*albicans* isolada de indivíduos saudáveis tem sido descrita e sua patogenicidade tem sido associada à capacidade de aderência às células do hospedeiro, formação de biofilmes e secreção de enzimas (SILVA *et al.*, 2011).

A espécie *C. tropicalis* tem sido isolada de infecções de orofaringe, queilite angular, candidíase interdital, vulvovaginites, além de estar frequentemente associada a infecções nosocomiais do trato urinário relacionada ao uso de sondas uretrais. Estudos recentes sobre a virulência desta espécie têm demonstrado a presença de proteinases, fosfolipases e capacidade de formação de biofilme (KOTHAVADE *et al.*, 2010).

*Candida glabrata* é frequentemente encontrada colonizando vários nichos em indivíduos saudáveis, porém vem sendo relatada como segunda ou terceira espécie de levedura associada à candidíases, isolada de infecções hospitalares a partir de biofilmes (FIDEL; VAZQUEZ; SOBEL, 1999). Possui alta capacidade de resistência aos agentes antifúngicos azólicos, especialmente ao fluconazol (SINGH-BABAK *et al.*, 2012; COLOMBO *et al.*, 2012).

A espécie *C. guilliermondii* tem sido isolada de pele, microbiota bucal, vias aéreas e trato genital em humanos. As infecções estão principalmente associadas a graves infecções e acometem principalmente pacientes com baixa imunidade. O isolamento de linhagens em ambientes clínicos tem se tornado motivo de preocupação devido à susceptibilidade reduzida a antifúngicos (SAVINI *et al.*, 2011).

Embora várias espécies de leveduras do gênero *Candida* vêm sendo identificadas, ainda existe pouca informação consistente sobre seus mecanismos de patogenicidade (SILVA *et al.*, 2011).

### 3.3.1 Formação de biofilmes por leveduras do gênero *Candida*

As leveduras do gênero *Candida* possuem a capacidade de aderirem a diferentes superfícies como pele, mucosas, acrílico e outros diferentes tipos de polímeros (CANNON; CHAFFIN, 1999).

O desenvolvimento de biofilmes de *C. albicans* ocorre em três fases, como observado em modelos *in vitro*. Na fase inicial, que acontece no período aproximado de 0 a 11 horas, células da levedura aproximam-se e aderem à superfície de suporte

e começam a se dividir formando uma camada de microcolônias. Essa aproximação pode ocorrer ao acaso ou devido às forças eletrostáticas. Durante este processo, acontece a interação das células da levedura com a superfície, mediada principalmente por adesinas (CHANDRA *et al.*, 2001).

Durante a fase intermediária, que acontece de 12 a 30 horas, as células aderidas à superfície se proliferam formando microcolônias e iniciando a formação da matriz extracelular. Nesta fase os mecanismos de comunicação intercelular sinalizam a expressão de pseudo-hifas e hifas, aumentando a coesão do biofilme com a matriz e com o substrato. O crescimento de células da levedura é continuada e acompanhada de produção de matriz extracelular (CHANDRA *et al.*, 2001).

Finalmente, na fase de maturação com um período aproximado de 38 a 72 horas ocorre aumento significativo de polímeros extracelulares e as hifas constituem um arranjo em rede, incorporada na matriz, formando um biofilme de aproximadamente 200µm de profundidade. No biofilme estabelecido ocorrem eventos dinâmicos de desenvolvimento de novas células e a diferenciação em pseudohifas, hifas e leveduras, envolvidas pela matriz extracelular. Ocorre ainda o desprendimento de células que poderão constituir outros sítios de formação de biofilmes (CHANDRA *et al.*, 2001).

A cinética desses acontecimentos depende do substrato e do meio de crescimento do biofilme (CHANDRA *et al.*, 2001; HAWSER; BAILLIE; DOUGLAS, 1998), bem como das características genóticas das linhagens da levedura (LI *et al.*, 2002). A composição dos biofilmes de leveduras do gênero *Candida*, especialmente *C. albicans*, consiste em uma mistura de células hospedeiras, células em forma de leveduras, pseudohifas e hifas, além da matriz extracelular composta de proteínas e polissacarídeos.

Nas leveduras do gênero *Candida* a superfície do substrato é um fator fundamental, pois em superfícies lisas o biofilme de *Candida* se desenvolve com menos habilidade do que em superfícies rugosas. Além disso, a afinidade de leveduras do gênero *Candida* por superfícies acrílicas têm sido demonstrada em infecções desencadeadas por colonização em cateteres, sondas e diversos tipos de próteses em acrílico (RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006).



### 3.3.2 Mecanismos de virulência em leveduras do gênero *Candida*

Os fatores de virulência das leveduras do gênero *Candida* têm papel essencial no processo infeccioso. Os principais fatores relacionados são a dimorfismo (variação morfológica), aderência, variabilidade fenotípica (switching), produção de enzimas extracelulares e toxinas (CHANDRA *et al.*, 2001; YANG, 2003).

A variação da morfologia celular de levedura para pseudohifa e hifa de grande parte das espécies de *Candida* em resposta a estímulos ambientais, é considerada como fator decisivo de invasão aos tecidos do hospedeiro, porém sabe-se que uma série de outros fatores também pode determinar sua virulência (SOLL, 2002).

A virulência de leveduras do gênero *Candida* está associada a vários fatores como a capacidade de adesão às células do hospedeiro, produção de proteinases, fosfolipases, hemolisinas, além da hidrofobicidade e coagregação com outros micro-organismos pela interação com componentes da matriz extracelular (GHANNOUM, 2000; SUGITA *et al.*, 2002).

A aderência é o primeiro passo no estabelecimento da infecção e parece ser modulada por uma variedade de adesinas que são expressas na superfície da parede celular (TRONCHIN *et al.*, 2008). Os mecanismos de aderência ocorrem principalmente por especificidade na interação ligante-receptor via adesinas (MANFREDI *et al.*, 2006).

As adesinas de sequência tipo aglutinina (ALS) são uma classe de adesinas produzidas amplamente por *C. albicans* e têm sido descritas como fundamentais no processo de aderência às células do hospedeiro (SUNDSTROM, 2002; FILLER, 2006). As Als1p e Als3p vêm sendo associadas à aderência ao endotélio e células endoteliais enquanto as Als5p vêm sendo associadas com a aderência à matriz extracelular. (LOZA *et al.*, 2004). Outra proteína que participa dos processos de aderência é a proteína de parede da hifa Hwp1p, encontrada exclusivamente na parede do tubo germinativo e descrita como envolvida na ligação às células do epitélio bucal (CHAFFIN *et al.*, 1998).

A parede celular de *C. albicans* é composta por polissacarídeos destacando-se D-glicose, D-manose e N-acetil-glicosamina (MASUOKA, 2004). Essa

composição e estrutura da parede celular podem ser moduladas pela levedura dependendo das condições do ambiente (CHAFFIN *et al.* 1998). As proteínas presentes na parede celular são em sua maioria manoproteínas representando 30% a 50% do peso seco. Além dessas duas classes de proteínas de parede celular são destacadas a glicosilfosfatidilinositol (GPI), que é representada pelas adesinas Als1p e Als3p, localizadas na camada externa da parede celular da levedura ligadas às  $\beta$ -glucanas por sua âncora, descritas por Hoyer (2001), além das proteínas PIR, codificadas pela família de genes *PIR* que encontram-se distribuídas uniformemente na camada interna da parede celular e ligadas às  $\beta$ -1,3-glucanas (TRONCHIN *et al.*, 2008).

Yang (2003) sugeriu a associação positiva entre o grau de virulência e a habilidade de formar biofilmes e essa evidência vem sendo estudada com a finalidade de elucidar esses mecanismos (CHANDRA; MUKHERJEE; GHANNOUM, 2008; SILVA *et al.*, 2011). De acordo com Ghannoum (2000), a soma de fatores associados à virulência, ambiente e condições ligadas ao hospedeiro, pode determinar a tendência de espécies de *Candida* em se tornarem saprófitas ou patogênicas.

A adesão dessas leveduras às superfícies das mucosas do hospedeiro ocorre pela interação entre adesinas da levedura e receptores das células epiteliais, sendo este um pré-requisito para a colonização e infecção (SAMARANAYAKE; MAC FARLANE, 1982; CANNON; CHAFFIN, 1999; TRONCHIN *et al.*, 2008).

Segundo Tronchin *et al.* (2008) as proteínas de matriz extracelular (ECM) fornecem condições para a fixação de micro-organismos pela criação de diversos sítios através da formação de uma rede complexa. Em mamíferos as moléculas envolvidas na aderência às ECM são compostas principalmente por receptores da família das integrinas e possuem sequências altamente conservadas que regulam as ligações matriz-célula e célula-célula. Entre as proteínas ECM produzidas por *C. albicans* provavelmente envolvidas nesse processo estão a vitronectina, colágeno tipo IV, laminina, fibronectina.

As proteases também estão entre os mecanismos de virulência de leveduras do gênero *Candida* e, com base no mecanismo catalítico, as proteases estão classificadas em quatro tipos, serinas, cisteínas, aspárticas e metaloproteases (MONOD *et al.*, 2002).

As aspartil proteases (Sap) de *C. albicans* são codificadas por 10 genes. A família de genes Sap fornece um eficiente sistema proteolítico tanto no comensalismo como nas infecções. A expressão de proteases é direcionada a atuar sobre tecidos específicos do hospedeiro (OLLERT *et al.*, 1995; HUBE; NAGLIK, 2001). A regulação dos genes *SAP* resulta em mudanças no ambiente de crescimento, na transição morfológica da levedura e na presença de fenótipos alternativos. Esse sistema é um processo regulado e interligado com outros fatores de virulência (NAGLIK *et al.*, 2004; SCHALLER *et al.*, 2005).

A levedura *C. albicans* secreta fosfolipases A, B, C e D. Estas enzimas hidrolizam a ligação éster de glicerofosfolípídeos. Sendo que cada enzima tem a habilidade de clivar uma ligação éster específica (GHANNOUM, 2000).

A tabela 2 destaca os principais mecanismos de virulência das leveduras do gênero *Candida*.

**TABELA 2 - PRINCIPAIS FATORES DE VIRULÊNCIA DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida***

<b>FATOR</b>	<b>FUNÇÃO</b>	<b>LOCALIZAÇÃO</b>
Adesinas ALS	Aderência às células do hospedeiro	Superfície celular
Hwp1p	Aderência às células do epitélio bucal	Parede do tubo germinativo
Proteínas de matriz Extracelular (vitronectina, colágeno tipo IV, laminina, fibrolectina)	Regulação de ligações matriz-célula e Célula-célula.	Superfície celular
Proteases (SAP)	Regulação relacionadas à mudanças no ambiente, degradação de substratos	Superfície celular
Fosfolipases	Patogenicidade, aderência e invasão às células do hospedeiro	Superfície celular
Adesinas Als1p e Als3p	Adesão e virulência	Superfície celular

FONTE: ADAPTADO PELO AUTOR (2014)

NOTA: BASEADO EM CHAFFIN *et al.*, 1998; HUBE *et al.*, 2000; CHANDRA *et al.*, 2001; HOYER, 2001; LOZA *et al.*, 2004; MONOD *et al.*, 2002.

As fosfolipases possuem importância na colonização e na infecção por *C. albicans*, atuando no controle de multiplicação da levedura e também na degradação dos constituintes fosfolipídicos da mucosa do hospedeiro (MATA DE HENNING; PERRONE, 2001).

Dez membros da família de genes lipase (*LIPs* 1-10) respondem pela atividade das fosfolipases secretadas por *C. albicans*. A maioria destes genes é transcrita durante a fase de transição de levedura para hifa. A fosfolipase B, produto do gene *LIP 1* é a enzima fosfolipídica mais estudada em *C. albicans*, à ela é

atribuída elevada virulência (HUBE *et al.*, 2000). Os fatores de virulência das leveduras do gênero *Candida* são determinados geneticamente e expressos em condições específicas para promover sua adaptação em diferentes situações.

### 3.3.3 Caracterização molecular de leveduras do gênero *Candida*

Para que o polimorfismo seja detectado, é necessário que as sequências de nucleotídeos, nas fitas de DNA de dois ou mais indivíduos comparados, sejam distintas (SCHERER; STEVENS, 1987).

Scherer e Stevens (1987) descreveram um dos primeiros métodos moleculares para a diferenciação de linhagens de *C. albicans* utilizando a técnica RFLP, que avalia o polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos por corte da fita dupla de DNA. Este polimorfismo é evidenciado pela fragmentação do DNA por enzimas de restrição e hibridização destes fragmentos com sequências homólogas de DNA marcadas com radioatividade ou compostos que desencadeiam uma reação de luminescência. Com base nesta metodologia, linhagens de *C. albicans* foram divididas em dois grandes grupos, com base na posição de uma banda dimórfica (genótipos do grupo A com uma banda de 3,7kb e genótipos do grupo B apresentando uma banda de 4,2kb).

O método descrito por Scherer e Stevens (1987) mostrou-se confiável e reprodutível e foi usado para um estudo epidemiológico de grande número de linhagens isoladas a partir de vários locais nos Estados Unidos e Reino Unido realizado por Stevens, Odds e Scherer (1990). Nesse estudo, os autores relataram que havia uma associação entre o genótipo grupo A com o aumento da resistência ao agente antifúngico flucitosina.

Mccullough, Clemons e Stevens (1999) através de ferramentas moleculares adicionais, caracterizaram o sistema ABC de genotipagem com a presença de quatro genótipos A (*C. albicans* - 450pb), B (*C. albicans* - 840pb), C (*C. stellatoidea* - 840pb) e D (*C. dubliniensis* - 1080pb), desenvolvida com base na presença ou ausência de uma inserção no DNA que codifica o gene do RNA ribossomal 26S.

Kurtzman e Robnett (1997) analisaram a divergência no domínio variável da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA para a identificação molecular de uma grande variedade de leveduras descrevendo a análise de 204 espécies.

A levedura *C. albicans* possui uma família de genes Agglutinin-Like Sequence (Als) que codifica glicoproteínas de superfície celular relacionadas ao processo de adesão às superfícies das membranas mucosas (GAUR; KLOTZ, 1997; HOYER, 2001). Nos biofilmes de *C. albicans*, o gene *Als3* codifica a expressão da adesina Als3, a qual possui papel importante na sinalização celular e na interação com o substrato, durante a formação do biofilme (CHANDRA *et al.*, 2001).

Green *et al.* 2004 estudaram a detecção por RT-PCR da expressão da família de genes ALS no epitélio humano reconstituído (RHE) de candidíase oral e biofilmes, sugerindo que esta metodologia possa ser utilizada para investigação de diversidade de expressão destes biofilmes, embora aos mecanismos de expressão desses genes não sejam bem conhecidos. Vários estudos demonstraram que genes ALS estão com sua expressão aumentada durante a formação do biofilme (CHANDRA *et al.*, 2001; GREEN *et al.*, 2004; O'CONNOR *et al.*, 2005).

O gene ALS1 em *C. albicans* foi descrito pela primeira vez por Hoyer *et al.* (1995) e, desde então, pesquisadores vêm tentando entender sua relação com o restante da família de genes ALS e explorando suas proteínas e funções. A família ALS presente em *C. albicans* inclui oito genes. Cada gene da família ALS apresenta uma estrutura similar composta por três domínios: um domínio 5', na extremidade N, composto por 1299 a 1308pb, que apresenta 55-90% de similaridade entre os diferentes genes da família; um domínio central variável, organizado em *tandem repeats*, com *motifs* de 108pb que se repetem ao longo do domínio; e um domínio 3', extremidade C, que é relativamente variável em tamanho e sequência de nucleotídeos entre os genes da mesma família (HOYER, 2001). Os genes da família ALS estão localizados em três cromossomos distintos: *ALS1*, *ALS2*, *ALS4*, *ALS5* e *ALS9* estão localizados no cromossomo 6, *ALS6* e *ALS7* estão localizados no cromossomo 3, e *ALS3* no cromossomo R (HOYER *et al.*, 1995; HOYER; HECHT 2001).

O tamanho de um mesmo gene ALS frequentemente varia dentro de uma mesma espécie e entre alelos de uma mesma linhagem, devido as diferenças no número de cópias dos *motifs* de 108pb organizados em *tandem repeat*, presentes no domínio central de cada gene (HOYER; HECHT, 2001). É comum, por exemplo, uma

mesma linhagem apresentar padrões diferentes (duas bandas) para o gene *ALS1* devido à variabilidade do número de repetições dos motivos na região do domínio central em cada alelo (HOYER, 2001).

Os genes *ALS* exibem diversos níveis de variabilidade, incluindo espécie-específica e alelo-específica, diferenças de tamanho para um mesmo gene, diferenças na regulação gênica espécie-específica, ausência de um gene *ALS* particular em certos isolados, e regiões codificadoras adicionais em outros (HOYER; HECHT, 2001).

Estudos moleculares sobre a expressão de genes de *ALS* demonstraram que os mesmos são regulados e expressos diferencialmente em função de processos fisiológicos celulares, tais como o estágio de crescimento e morfologia da célula, ou seja, predominantemente leveduriforme ou na forma de hifas e pseudo-hifas (HOYER *et al.*, 1995; HOYER *et al.*, 1998).

García-Sánchez *et al.* (2004) constataram que o gene *ALS1*, que codifica glicoproteínas de superfície celular, apresenta-se em alta expressão em células do biofilme de *C. albicans*, enquanto que Hoyer *et al.* (1998) detectaram alta expressão associada ao gene *ALS3*, porém, aparentemente associada à produção de hifas de *C. albicans* (HOYER *et al.*, 1998).

Nailis *et al.* (2010) compararam a expressão gênica de *ALS1* e *ALS3* entre as células do biofilme de *C. albicans* formadas sobre superfície de silicone e as células em suspensão (planctônicas) e constataram um significativo aumento da expressão de *ALS1* nas células do biofilme, e uma diminuição da expressão de *ALS3*. Por outro lado, Nobile *et al.* (2008) concluíram, após vários testes com mutantes *als1/als1 als3/als3*, que *ALS3* e *ALS1* são essenciais para a formação do biofilme *in vivo* e a redução na expressão dessas proteínas acarreta na formação de um biofilme frágil, suas funções no biofilme são compatíveis com sua estrutura e propriedade bioquímica.

Nobile *et al.* (2008) ainda sugeriram que as funções de Als1 e Als3 possam ser complementares à função de Hwp1. Nailis *et al.* (2010) investigaram por PCR em tempo real o perfil de expressão de genes que codificam potenciais fatores de virulência em biofilmes de *Candida albicans*, concluindo que *HWP1* e a maioria dos genes pertencentes às famílias *ALS*, *SAP* e *LIP* são *upregulated* nos biofilmes *in vitro* de *C. albicans*. Portanto, a necessidade de utilizar vários sistemas modelo

quando se estuda a expressão de genes que codificam potenciais fatores de virulência em *C. albicans* biofilmes têm sido sugeridos.

Para interpretar os fatores de virulência dos micro-organismos, marcadores moleculares têm sido cada vez mais utilizados. Essas técnicas permitem o grande avanço no campo da epidemiologia de doenças infecciosas e trazem informações sobre a interação genética destes organismos (NAGLIK *et al.*, 2004).

### 3.4 INTERAÇÃO ENTRE *Streptococcus mutans* E *Candida albicans* NA FORMAÇÃO DE BIOFILME

As leveduras do gênero *Candida* frequentemente compõem parte da microbiota bucal e são reconhecidas como potenciais agentes patológicos (CANNON *et al.*, 1995; HOFLING *et al.*, 2011). A presença de *C. albicans* em lesões cariosas já estabelecidas tem sido demonstrada, além da capacidade de invasão de tecidos e materiais artificiais que permanecem no meio bucal como, por exemplo, o acrílico, utilizado em muitos tipos de próteses e aparelhos ortodônticos (CANNON *et al.*, 1995; SEN; KAMRAM; LARS, 1997; AKDENIZ *et al.*, 2002; NIKAWA *et al.*, 2003; CARRETO *et al.*, 2007).

Dentre a diversidade de micro-organismos que compõe o biofilme bucal em seus vários nichos, as leveduras do gênero *Candida* frequentemente colonizam a boca como organismo saprófita e oportunista, e estão presentes nos biofilmes nas superfícies dentárias em coagregação com *S. mutans* durante os mecanismos de aderência microbiana (AKDENIZ *et al.*, 2002). A presença e persistência de *C. albicans* nos biofilmes bucais também pode ser um fator de aumento da colonização por *S. mutans* (BARBIERI *et al.*, 2007; GREGOIRE *et al.*, 2011).

A habilidade da levedura *C. albicans* variar sua morfologia entre leveduriforme e hifas contribui para a sua patogênese. Na microbiota bucal, a coagregação entre a levedura *C. albicans* e *S. mutans* é fundamental para sua colonização e persistência. Além disso, essa cooperação promove sítios extras de adesão nos quais a excreção de lactato pela bactéria pode agir como fonte de carbono para o desenvolvimento da levedura, a qual em seu processo metabólico reduz a tensão de oxigênio a níveis preferenciais, beneficiando a bactéria *S. mutans* e promovendo a estimulação de fatores de virulência (BROGDEN, 2008).

Vílchez *et al.* (2010) estudando mecanismos de interação entre *C. albicans* e *S. mutans* concluíram que houve inibição do desenvolvimento de hifas pela levedura relacionada à excreção de ácido trans-2-decenóico capaz de suprimir a transição de levedura para hifa. O mesmo foi observado com relação aos estreptococos *S. mitis*, *S. oralis*, e *S. sanguinis*, porém outros estreptococos bucais não exibiram essa capacidade. Este achado pode ser relevante no estudo da morfologia dos biofilmes formados por esses organismos.

Gregoire *et al.* (2011) estudaram o papel da enzima GTF-B na interação entre *S. mutans* e *C. albicans* num modelo de película adquirida experimental, em superfície de hidroxiapatita. Os autores observaram que a GTF-B produzida por *S. mutans* na presença de sacarose realiza a síntese de glucanos, os quais representam novos sítios de aderência entre as diferentes células que compõem o biofilme, incluindo as células de *S. mutans*. Além disso, a GTF-B pode se ligar à superfície da hidroxiapatita e às células da levedura quando presentes no biofilme. Tais ligações promovem o aumento de EPS *in situ*, inclusive tornando células não produtoras da enzima, metabolicamente ativas devido aos mecanismos de adsorção descritos. Os autores concluíram que a presença de células da levedura revestidas com glucanos aumentou significativamente o acúmulo de *S. mutans* na superfície analisada. A enzima GTF-B ligada à superfície promove a formação de uma matriz rica em glucano e pode aumentar o acúmulo de *S. mutans* na superfície do esmalte dos dentes, modulando assim o desenvolvimento de biofilmes virulentos.

Lai e Li (2011) sugeriram o possível papel da levedura *C. albicans* na progressão de lesões de cárie dental pela capacidade de degradação da estrutura orgânica da dentina pelas enzimas collagenases, implicando na progressão de cáries associada à colonização por *C. albicans*.

Raja, Hannan e Ali, (2010) analisando a associação de crianças portadoras de *Candida* spp. e cáries encontraram alta frequência de portadores da levedura entre crianças com atividade de cárie em comparação com crianças livres de cárie, sugerindo que a colonização pela levedura possa predizer o risco de desenvolvimento da doença.

O risco à cárie pode ser definido como a probabilidade de um indivíduo desenvolver novas lesões cariosas (KRASSE, 1988; HAUSEN, 2005). Para saber se determinada doença possui um risco maior ou menor, é necessária a avaliação de fatores indicadores desse risco.



Os fatores de risco para o desenvolvimento da cárie dentária são aqueles envolvidos aos eventos bioquímicos ou relacionados à saúde geral, epidemiológicos e clínicos. A experiência passada de cárie é considerada um confiável fator preditivo do risco, sendo assim, o índice CPO-D (Dentes Cariados, Perdidos e Obturados para a dentição permanente e o índice ceo-d (Dentes cariados, Com extração indicada por cárie e Restaurados) para a dentição decídua (temporária), descritos inicialmente por Klein e Palmer (1937) ) são os índices mais utilizados mundialmente para o diagnóstico do histórico de cárie de um indivíduo ou de uma população.

É importante considerar que a doença cárie sofre influência de inúmeros fatores relacionados à suscetibilidade individual, resposta imunológica, dieta, hábitos de higiene, presença do flúor, entre outros (BEIGHTON; ADAMSON; RUGG-GUNN, 1996). Além disso, observa-se a grande diversidade genética e fenotípica nas espécies colonizadoras da microbiota bucal e suas interações (CAUFIELD; CUTTER; DASANAYAKE, 1993).

## 4 METODOLOGIA

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa SCS/UFPR número 014SL014-03-11 UFPR (ANEXO 1).

### 4.1 LINHAGENS UTILIZADAS

Um total de 83 isolados de *S.mutans* e 31 isolados de leveduras do gênero *Candida* foram obtidos a partir de amostras de saliva e biofilme dental de crianças em idade escolar com diferentes históricos da doença cárie, residentes na cidade de Curitiba, Paraná, Brasil.

As linhagens referências de *C. albicans* e de *S. mutans* incluídas neste estudo, assim como o número de acesso das sequências obtidas no NCBI (National Center for Biotechnology Information), estão sumarizadas na tabela 3.

**TABELA 3 - LINHAGENS REFERÊNCIAS UTILIZADAS NESTE ESTUDO**

Identificação	Coleção de Cultura	Número de Acesso Genbank*		Fonte	Localização Geográfica
		Candida (ITS/ D1D2) e Streptococcus (Gtf-B /HtrA)			
<i>Candida albicans</i>	CBS 562	ITS:EF56799	D1D2:U45776	Isolado Clínico	Australia
<i>Candida dubliniensis</i>	CBS 7987	ITS:AB035589	D1D2: U57685	Isolado Clínico	Japão
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 96138	ITS:AY497736	D1D2:AY497665	Isolado Clínico	EUA
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 96140	ITS:AY497737	D1D2:AY497666	Isolado Clínico	EUA
<i>Candida tropicalis</i>	CBS 94	ITS:AB437068	D1D2:U45749	Isolado Clínico	Japão
<i>Candida Africana</i>	CBS 8781	ITS:AY342214	D1D2:AM495238	Isolado Clínico	Alemanha
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	CBS 2030	ITS:EF568003	D1D2:AY497675	Isolado Clínico	Australia
<i>Debaryomyces carsonii</i>	CBS 2285	ITS:AJ853767	D1D2:U45743	Isolado Clínico	USA
<i>Pichia segobiensis</i>	CECT 10-210	ITS:DQ409166	D1D2:U45742	Desconhecido	Espanha
<i>Clavispora lusitaniae</i>	CBS 6986	ITS:EF568049	D1D2:U44817	Urina	Bulgaria
<i>Candida intermedia</i>	CBS 572	ITS:EF568011	D1D2:U44809	Isolado Clínico	Australia
<i>Candida haemulonii</i>	CBS 5149	ITS:JX459660	D1D2:U44812	Isolado Clínico	EUA
<i>Candida glabrata</i>	CBS 138	ITS:AY198398	D1D2:U44808	Isolado Clínico	Irlanda
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	CBS 712	ITS:EF568057	D1D2:U94924	Isolado Clínico	Australia
<i>Kluyveromyces lactis</i>	CECT1961	ITS:AJ401704	D1D2:U94922	Meio Ambiente	EUA

Continua

Continuação

Identificação	Coleção de Cultura	Número de Acesso Genbank*		Fonte	Localização Geográfica
		Candida (ITS/ D1D2) e Streptococcus (Gtf-B /HtrA)			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NRRL Y-12632	ITS:AY046146	D1D2:AY048154	Meio Ambiente	EUA
<i>Pichia fermentans</i>	L1B	ITS:FJ713081	D1D2:U75726	Meio Ambiente	Reino Unido
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	CBS 133T	ITS:--	D1D2:AJ508558	Desconhecido	Austrália
<i>Candida inconspícua</i>	CBS 180	ITS:AJ853766	D1D2:U71062	Isolado Clínico	Australia
<i>Pichia membranifaciens</i>	ISOLATE23	ITS:JQ410476	D1D2:AJ508586	Desconhecido	Espanha
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NRRL Y-12796	ITS:AY 251633	D1D2:U40085	Desconhecido	EUA
<i>Streptococcus mutans</i>	AF199	Gtf-B:JX072971	HtrA:--	Isolado Bucal	EUA
<i>Streptococcus mutans</i>	JP9-4	Gtf-B:JX072978	HtrA:--	Isolado Bucal	EUA
<i>Streptococcus mutans</i>	BZ15	Gtf-B:JX072975	HtrA:--	Isolado Bucal	EUA
<i>Streptococcus mutans</i>	UA113	Gtf-B:JX072981	HtrA:--	Isolado Bucal	EUA
<i>Streptococcus mutans</i>	UA114	Gtf-B: JX072982	HtrA:--	Isolado Bucal	EUA
<i>Streptococcus mutans</i>	UA140	Gtf-B: JX072983	HtrA:--	Isolado Bucal	EUA
<i>Streptococcus mutans</i>	UA174	Gtf-B: JX072984	HtrA:--	Isolado Bucal	EUA
<i>Streptococcus mutans</i>	UA545	Gtf-B: JX072986	HtrA:--	Isolado Bucal	EUA
<i>Streptococcus mutans</i>	UA96	Gtf-B: JX072987	HtrA:--	Isolado Bucal	EUA
<i>Streptococcus mutans</i>	UA159	Gtf-B: AE014133	HtrA:149212423	Isolado Bucal	EUA
<i>Streptococcus mutans</i>	UA318	Gtf-B: JX072985	HtrA:--	Isolado Bucal	EUA
<i>Streptococcus mutans</i>	BV24	Gtf-B: JX072974	HtrA:--	Isolado Bucal	EUA
<i>Streptococcus mutans</i>	CH638	Gtf-B: JX072976	HtrA:--	Isolado Bucal	EUA
<i>Streptococcus mutans</i>	CH639	Gtf-B: JX072977	HtrA:--	Isolado Bucal	EUA
<i>Streptococcus mutans</i>	GS5	Gtf-B: CP003686	HtrA:149212431	Cárie Dental	EUA
<i>Streptococcus mutans</i>	Isolate 01	Gtf-B: HE962158	HtrA:--	Saliva	Brasil
<i>Streptococcus mutans</i>	Isolate 02	Gtf-B: HE962159	HtrA:--	Saliva	Brasil
<i>Streptococcus mutans</i>	Isolate 08	Gtf-B: HE962165	HtrA:--	Saliva	Brasil
<i>Streptococcus mutans</i>	Isolate 09	Gtf-B: HE962166	HtrA:--	Saliva	Brasil
<i>Streptococcus mutans</i>	Isolate 14	Gtf-B: HE962171	HtrA:--	Saliva	Brasil
<i>Streptococcus mutans</i>	Isolate 16	Gtf-B: HE962173	HtrA:--	Saliva	Brasil
<i>Streptococcus mutans</i>	LJ23	Gtf-B: NC017768	HtrA:--	Isolado Bucal	Japão
<i>Streptococcus mutans</i>	NN2025	Gtf-B: NC013928	HtrA:--	Isolado Bucal	Japão
<i>Streptococcus mutans</i>	ASEGA	Gtf-B: JX072972	HtrA:--	Isolado Bucal	EUA
<i>Streptococcus mutans</i>	LEO	Gtf-B: JX072979	HtrA:--	Isolado Bucal	EUA
<i>Streptococcus mutans</i>	10449	Gtf-B:--	HtrA:149212425	Isolado Bucal	EUA
<i>Streptococcus mutans</i>	INBRITT	Gtf-B:--	HtrA:EF533874	Isolado Bucal	EUA
<i>Streptococcus mutans</i>	25-2	Gtf-B:--	HtrA:149212427	Isolado Bucal	EUA
<i>Streptococcus mutans</i>	25-18	Gtf-B:--	HtrA:149212437	Isolado Bucal	EUA

Continua

Continuação

Identificação	Coleção de Cultura	Número de Acesso Genbank*		Fonte	Localização Geográfica
		Candida (ITS/ D1D2) e Streptococcus (Gtf-B /HtrA)			
<i>Streptococcus mutans</i>	LM7	Gtf-B:--	HtrA:149212433	Isolado Bucal	EUA
<i>Streptococcus mutans</i>	OMZ175	Gtf-B:--	HtrA:149212429	Isolado Bucal	EUA
<i>Streptococcus sobrinus</i>	TCI-16	Gtf-B:--	HtrA:AGGD01000201	Isolado Bucal	EUA
<i>Streptococcus salivarius</i>	CCHSS3	Gtf-B:--	HtrA: NC_015760	Isolado Bucal	EUA
<i>Streptococcus vestibularis</i>	F0396	Gtf-B:--	HtrA:AEKO00000000	Isolado Bucal	EUA
<i>Streptococcus cricetti</i>	HS-6	Gtf-B:--	HtrA:AEUV02000002	Isolado Bucal	EUA

FONTE: BANCO DE DADOS NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

NOTA: (\*) NÚMERO DE ACESSO DAS SEQUÊNCIAS DAS LINHAGENS REFERÊNCIAS.

## 4.2 CASUÍSTICA

Para a coleta das amostras clínicas foram adotados os seguintes critérios de inclusão: crianças de ambos os gêneros, com idades entre 9 e 11 anos correspondente à dentição mista, estudantes e residentes na cidade de Curitiba, Paraná, Brasil, biofilme dental detectado visualmente sem uso de evidenciadores, nas superfícies vestibulares de pelo menos dois dentes incisivos, com ou sem atividade de cárie. Os critérios de exclusão foram definidos por não utilização de antibióticos ou antissépticos bucais por no mínimo sete dias antes da coleta, não acometimento por doenças crônicas, não utilização de aparelhos ou dispositivos ortodônticos. Foram enviados 50 termos de consentimento informado (APÊNDICE 1) para os responsáveis, dos quais 38 foram devidamente assinados e devolvidos.

## 4.3 EXAME CLÍNICO

As crianças participantes deste estudo foram submetidas à avaliação clínica, executada por um único examinador, que avaliou a presença de biofilme dental nas superfícies vestibulares dos dentes incisivos centrais e laterais, presença de lesões de cárie, dentes restaurados e dentes presentes. A presença de biofilme dental na superfície vestibular dos incisivos foi notada por exame visual, sem uso de corantes,

sendo que, quando existia biofilme visível, em dois ou mais incisivos, a criança era classificada positivamente para este fator e selecionada para coleta. A atividade de cárie foi considerada quando no momento do exame clínico a criança apresentava lesão de cárie. O histórico de cárie de cada criança foi baseado na soma dos índices CPO-D (dentes permanentes cariados, perdidos ou restaurados por cárie) e ceo-d (dentes decíduos cariados, perdidos ou restaurados por cárie). A ficha de avaliação clínica está apresentada no (APÊNDICE 2).

#### 4.4 COLETAS DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

As coletas salivares foram realizadas com técnica não estimulada, em recipientes plásticos, esterilizados, com tampa, instruindo a criança para que depositasse sua saliva dentro do recipiente até que o volume coletado fosse de aproximadamente 3mL. A coleta de biofilme dental foi realizada friccionando um swab na superfície vestibular de um único dente incisivo selecionado e em seguida acondicionando o swab em um tubo esterilizado contendo solução tampão fosfato salino (PBS). As amostras foram transportadas em recipiente térmico com gelo e processadas em até 2 horas após a coleta, utilizadas tanto para o isolamento de leveduras do gênero *Candida* como para o isolamento de *S.mutans*.

#### 4.5 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*

Para o isolamento de *C. albicans* amostras salivares foram diluídas a 1:10 e 1:100 em caldo Sabouraud e homogeneizadas em agitador vortex. A partir desta diluição, um volume de 0,1mL de cada amostra foi semeada em Ágar Sabouraud Dextrose, e incubada a 30°C por um período de 48 horas até 7 dias. As amostras de biofilme imersas em PBS foram homogeneizadas, diluídas (1:10 e 1:100), semeadas (0,1mL) em Ágar Sabouraud Dextrose e incubadas sob as mesmas condições. As colônias desenvolvidas no meio de cultura foram identificadas por suas características morfológicas macroscópicas e microscópicas. Colônias esféricas, branco-foscas com aspecto de porcelana, diâmetro de 1 a 8mm e odor característico

do gênero, foram submetidas à coloração de Gram e observadas em microscópio óptico.

A contagem estimada do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foi realizada multiplicando-se a alíquota utilizada (0,1mL) por 10 para a correspondência de volume, e o número de colônias desenvolvidas em cada placa pelo fator de diluição da amostra salivar. Uma amostragem de 2 a 3 colônias de cada placa foram repicadas para tubos contendo Ágar Batata Dextrose, e incubadas a 37°C por 24 horas com posterior repique em CHROMagar a 37°C por 48 horas. Os resultados foram baseados na alteração de coloração do meio, de acordo com o padrão estabelecido pelo fabricante para a diferenciação das espécies albicans e não-albicans (ODDS; BERNAERTS, 1994).

Os isolados foram conservados em Ágar Batata Dextrose com repiques periódicos e estocados em tubos do tipo *ependorfs* contendo meio de cultura “*Skim Milk*” em triplicata a uma temperatura de -80°C.

#### 4.6 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO *Streptococcus mutans*

Para o isolamento de *S. mutans* as amostras salivares foram diluídas (1:10, 1:100 e 1:1000) em tampão fosfato salino (PBS), homogeneizadas em vortex e um volume de 0,1mL de cada diluição foi inoculado em Ágar Mitis Salivarius adicionado de bacitracina (30 mg/mL de meio), telurito de potássio (0,00005%) e incubada a 37°C por 48 horas, em microaerofilia, com uso de jarra de Gaspack (GOLD; JORDAN; VAN HOUTE, 1973). Após incubação, foi realizada a contagem estimada do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) multiplicando-se a alíquota utilizada (0,1mL) por 10 para a correspondência de volume, e o número de colônias desenvolvidas em cada placa pelo fator de diluição da amostra salivar.

Duas a três colônias com morfologia característica de *S. mutans* foram selecionadas para a realização de provas bioquímicas e análise micromorfológica por meio da coloração de Gram, concluindo assim, a identificação presuntiva (HOLT *et al.*, 1994).

#### 4.6.1 METODOLOGIA DAS PROVAS BIOQUÍMICAS REALIZADAS PARA IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DE *S. mutans* (HOLT *et al.* 1994)

##### 4.6.1.1 PROVA DA CATALASE

A prova foi realizada colocando-se peróxido de hidrogênio 3% sobre colônias características crescidas no AMSB, observando-se efervescência, indicando a formação de gás (prova positiva).

##### 4.6.1.2 PROVA DA FERMENTAÇÃO DO SORBITOL E MANITOL

Um volume de 0,1mL de cultura pura cultivada em meio base caldo BHI, foi adicionada em um meio contendo manitol ou sorbitol e indicador de pH (púrpura de bromocresol). Os meios foram incubados a 37°C por 48 horas. A prova foi considerada positiva quando ocorreu acidificação do meio com mudança de pH e consequente mudança da coloração do meio de roxo para amarelo.

##### 4.6.1.3 PROVA DA HIDRÓLISE DA ESCULINA

Um volume de 0,1mL de cultura pura foi semeado em Ágar Esculina Inclinado. Após incubação a 37°C por 48 horas o desenvolvimento de coloração negra determinou a positividade da prova.

##### 4.6.1.4 PROVA DA HIDRÓLISE DA ARGININA

Um volume de 0,1 mL de cultura pura do micro-organismo foi adicionado em meio base caldo BHI, contendo arginina e indicador de pH (púrpura de bromocresol). O tubo inoculado foi vedado com óleo mineral e incubado a 37°C por 48 horas. Inicialmente, a cor do meio altera para amarelo devido à acidificação pela fermentação da glicose presente no meio. Se a arginina é descarboxilada, pela

presença da enzima dihidrolase, um produto final alcalino reverte o indicador para coloração púrpura, indicando a reação positiva.

As características diferenciais das espécies de *Streptococcus* do grupo mutans, baseado em provas bioquímicas e de sensibilidade à bacitracina estão apresentadas na tabela 4. Para a conservação dos isolados de *S. mutans* os mesmos foram suspensos em glicerol 20% e estocados em freezer -80 °C.

**TABELA 4** - CARACTERÍSTICAS DIFERENCIAIS DAS ESPÉCIES DE *Streptococcus* DO GRUPO MUTANS, BASEADO EM PROVAS BIOQUÍMICAS E DE SENSIBILIDADE À BACITRACINA

Provas	<i>S. mutans</i>	<i>S. rattus</i>	<i>S. cricetus</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. ferus</i>	<i>S. macacae</i>	<i>S. downei</i>
Sorotipos	c/e/f	B	a	d/g	E	e	H
Fermentação Manitol	+	+	+	+	+	+	+
Fermentação Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+
Fermentação Melbiose	+	+	+	+	-	-	-
Fermentação Rafinose	+	+	+	+	-	-	-
Produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	-	-	+	-	-	-
Hidrólise Arginina	-	+	-	-	-	-	-
Esculina	+	+	d	d	+	+	-
Resistência Bacitracina		+	-	+	-	-	-

FONTE: BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, HOLT *et al.* 1994

NOTA: (\*) ALGUMAS LINHAGENS PODEM APRESENTAR RESULTADOS NEGATIVOS; (\*\*) ALGUMAS LINHAGENS PODEM APRESENTAR RESULTADOS POSITIVOS; (d) 11-89% DAS LINHAGENS SÃO POSITIVAS.

## 4.7 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

### 4.7.1 Extração de DNA

As extrações de DNA foram baseadas em Vicente (2008). As colônias de *S. mutans* foram previamente inoculadas em caldo BHI e incubadas por 24 horas a 36°C. As colônias de leveduras do gênero *Candida* foram inoculadas em placas com Ágar Sabouraud por 48 horas.



Para a extração de DNA de *S. mutans*, após o período de incubação, as culturas de *S. mutans* foram centrifugadas a 49000 x g por 2 min e o sedimento transferido para um microtubo, tipo eppendorf, contendo uma mistura de sílica em pó (sílica gel Merck) e celite 2:1, em 600µL de Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB). Em seguida foram aplicados três pulsos (30 seg) de ultrassom (potência 70), com intervalos de 30 seg entre cada pulso, em banho de gelo, utilizando disruptor de célula ultrassônico (Unique® - Modelo DES500).

Para a extração de DNA das leveduras do gênero *Candida*, após a incubação, foram removidas 2 a 3 alçadas de colônias que foram submetidas à maceração física com sílica: celite (2:1) com auxílio de maceradores de vidro.

A partir desta etapa os procedimentos foram os mesmos para *S. mutans* e *C. albicans*. Então, um volume 400µL de CTAB foi adicionado ao microtubo e as amostras incubadas em banho-maria a 65°C por 10 min. Após atingir temperatura ambiente, foram adicionados 1000µL de clorofórmio-álcool isoamílico (CIA) e os tubos centrifugados a 49000 x g por 7 min. O sobrenadante foi transferido a outro tubo, ao qual foram adicionados mais 1000µL de CIA e a centrifugação repetida. Cerca de 2000µL de álcool 96% gelado foram adicionados ao sobrenadante e os tubos incubados a -20°C por 30 min para precipitação dos ácidos nucleicos, e após este período foram centrifugados a 49000 x g por 7 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com álcool 70% gelado e repetida a centrifugação a 49000 x g por 7 min. O álcool foi retirado e os tubos vertidos em fluxo laminar até a secagem completa do precipitado. Posteriormente, foram adicionados 50µL de água ultrapura para ressuspender o DNA. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 24 horas e armazenados a 4°C. A integridade foi verificada mediante eletroforese em gel de agarose 0,8%, e visualizada com brometo de etídio em UV.

#### 4.7.2 Caracterização Molecular de Leveduras do gênero *Candida*

##### 4.7.2.1 Genotipagem de *Candida albicans* pelo sistema ABC

Para a determinação da genotipagem pelo sistema ABC de *C. albicans*, realizou-se a amplificação da região de interesse com os primers descritos na tabela

5, de acordo com Mccullough, Clemons e Stevens (1999). As condições da reação foram: 1,0µL de DNA 20ng/µL, 1,3µL de tampão PCR 1x (100mM tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 3.5mM MgCl<sub>2</sub>), 1µL de mix dNTP (100mM each dNTP), 0,6µL de cada iniciador (10 mM) e 1 unidade de Taq DNA polimerase, totalizando um volume final de 12,5µL. Para a termociclagem utilizou-se desnaturação inicial a 94°C por 3 min, quarenta ciclos de desnaturação a 96°C por 15 seg, anelamento a 60°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e uma extensão final a 72°C por 3 min. Os produtos foram visualizados em gel de agarose a 1,5%, corados por GelRed (BIOTIUM®). O marcador de massa utilizado foi 1Kb (Invitrogen®).

#### 4.7.2.2 Ribotipagem e Sequenciamento

Para a ribotipagem foram utilizados os conjuntos de *primers* relacionados na tabela 5. As condições de reação da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA foram realizadas de acordo com Vicente *et al.* (2008), para a região D1/D2 foram utilizadas as condições descritas por Page e Kurtzman, 2005. As condições de amplificação para as duas regiões consistiram de um ciclo de 94°C por 2 min, trinta ciclos de 94°C por 30 seg, 56°C por 1 min, 72°C por 1 min e um ciclo de 72°C por 3 min (VICENTE, 2008).

Os produtos de PCR foram tratados com enzimas ExoSAP (ExoSAP-IT, GE Healthcare, USA) (DUGAN *et al.*, 2002) para sua purificação. A reação de sequenciamento foi feita utilizando BigDye Terminator Cycle Kit v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) seguindo as instruções do fabricante, os produtos de sequenciamento foram purificados com Sephadex®-GE (CROUS *et al.*, 2009). O produto foi sequenciado no Sequenciador Genético de DNA ABI Prism 3700 DNA Sequencer (Perkin-Elmer, Norwalk, Foster City, CA, USA).

**TABELA 5 - PRIMERS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Candida***

Locus	Primer	Sequencia 3'- 5'	PB	Região genoma	Referência
<b>SISTEMA ABC</b>	CA-INT-L	5'ATAAGGGAAGTCGGC AAAATAGATCCGTAA3'	Genótipo A: ~450 Genótipo B: ~840 Genótipo C: ~450 e 840 Genótipo D: ~1080	Subunidade maior do rDNA	McCullough; Clemons; Stevens, 1999
	CA-INT-R	5'CCTTGGCTGTGGTTTC GCTAGATAGTAGAT3'			
<b>ITS1;5.8S; ITS2</b>	V9G	5'TTACGTCCCTGCCCTT TGTA3'	483	ITS1- 5,8S - ITS2 rDNA	Gerrits Van Den Ende; De Hoog, 1999
	LS266	5'GCATTCCCAAACAAC CGACTC3'			
<b>ITS1;5.8S; ITS2</b>	ITS1	5'TCCGTAGGTGAACCT GCGG3'	600	ITS1- 5,8S - ITS2 rDNA	White <i>et al.</i> , 1990
	ITS4	5'TCCTCCGCTTATTGAT AT3'			
<b>D1/D2 rDNA</b>	NL1	5'GCATATCAATAAGCGG AGGAAAG-3'	500 - 600	Domínio variável da subunidade maior do rDNA	Page; Kurtzman, 2005
	NL4	5'GGTCCGTGTTTCAAGA CGG-3'			

FONTE: ADAPTADO PELO AUTOR (2014)

#### 4.7.3 Caracterização molecular de *Streptococcus mutans*

Para a ribotipagem foram utilizados os conjuntos de *primers* relacionados na tabela 6. As condições de amplificação para a região do gene *HtrA* do rDNA consistiram de um ciclo de 95°C por 2 min, quarenta ciclos de 95°C por 30 seg, 60°C por 30 seg, 72°C por 1 min e um ciclo de 72°C por 5 min (CHEN *et al.*, 2007).

Para a amplificação da região parcial do gene *Gtf-B* rDNA foi utilizada a condição de amplificação com um ciclo inicial de desnaturação de 95°C por 5 min, seguida por 30 ciclos desnaturação (95°C por 30 seg), anelamento (59°C por 30 seg), e extensão (72°C por 1 min). A etapa de extensão final foi de 72°C por 7 min.

Os produtos de PCR foram tratados com enzimas ExoSAP (ExoSAP-IT, GE Healthcare, USA) (DUGAN *et al.*, 2002) para sua purificação e a reação de sequenciamento foi feita utilizando ambos os primers iniciadores com BigDye Terminator Cycle Kit v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) seguindo as instruções do fabricante, e as sequências analisadas no termociclador ABI Prism 3700DNA Sequencer (Perkin-Elmer, Norwalk, Foster City, CA, USA).

**TABELA 6 - PRIMERS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE *Streptococcus mutans***

Localização	Primer	Sequencia 3'- 5'	pb	Região Genoma	Referência
<b>HtrA</b>	Sm479-F Sm479-R	5'TCGCGAAAAAGATAAAACAAACA3' 5'GCCCCTTCACAGTTGGTTAG3'	479	Gene <i>HtrA</i>	Chen <i>et al.</i> , 2007
<b>Gtf-B</b>	<i>GtfB</i> -F <i>GtfB</i> -R	5'ACTACACTTTTCGGGTGGCTTGG3' 5'CAGTATAAGCGCCAGTTTCATC3'	517	Gene <i>gtf-B</i>	Oho <i>et al.</i> , 2000
<b>Gtf-B</b>	NL1 NL4	5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG3' 5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG3'	517	Região parcial do gene <i>gtf-B</i>	Oho <i>et al.</i> , 2000

FONTE: ADAPTADO PELO AUTOR (2014)

#### 4.7.4 Alinhamento e construção filogenética

Os consensos das sequências dos isolados das leveduras do gênero *Candida* e de *S. mutans* foram inspecionados com a utilização do software MEGA v.5.0 (TAMURA *et al.*, 2011). As linhagens utilizadas como referências para as análises filogenéticas estão sumarizadas na tabela 3.

Para a análise das leveduras do gênero *Candida* foi utilizada como grupo externo a linhagem de referência *Schizosaccharomyces pombe*, baseada em Tsui *et al.* (2008). O alinhamento das sequências obtidas foi realizado com a utilização da interface online MAFFT (KATO; TOH, 2008; <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>). As análises filogenéticas foram conduzidas usando Máxima Verosimilhança e a árvore foi construída com utilização do software MEGA 5.0 com 1000 repetições bootstrap utilizadas para estimar os valores de confiança para clados individuais e são apresentados ao lado dos ramos (TAMURA *et al.*, 2011).

As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Tamura-3 parâmetros e a variação da taxa entre os locais foi modelada com uma distribuição gama. As sequências geradas no presente estudo foram depositadas no banco de dados NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

#### 4.8 PRODUÇÃO DE BIOFILME *in vitro*

Os testes de produção de biofilme para os isolados de leveduras do gênero *Candida* e *S. mutans* foram baseados na metodologia de Yoshida e Kuramitsu (2002) e Barbieri *et al.* (2007).

Os biofilmes *in vitro* foram produzidos em microplacas de poliestireno de 96 poços (GLASSCYTO®) para os isolados do gênero *Candida* e de *S. mutans* com três repetições. Inicialmente os isolados foram cultivados a 37°C por 48 horas em caldo BHI sacarosado (5%) em condições microaerófilas (Jarra de Gaspack) para os isolados de *S. mutans*, e padronizados em espectrofotômetro numa suspensão correspondente de  $10^7$  células.

Na microplaca de poliestireno foram adicionados 50µL de caldo BHI sacarosado (5%) em cada poço, em seguida mais 50µL da suspensão padronizada dos inóculos. Como controle negativo foi utilizado 50µL gluconato de clorexidine 0,12% e 50µL de caldo BHI sacarosado (5%).

As microplacas foram incubadas por 48 horas em condições de microaerofilia para os isolados de *S. mutans* e para os isolados de *Candida* spp. Após a incubação os volumes foram removidos do interior dos poços da microplaca e esta suavemente lavada com água destilada com a finalidade de remover as células fracamente aderidas ao poliestireno. Subsequentemente foram adicionados 150µL de solução de cristal violeta 1% em cada poço com a finalidade de corar o biofilme aderido às paredes dos poços. Após 30 min as microplacas foram lavadas 3 vezes com água destilada e secas ao ar ambiente por 2 horas.

Com a finalidade de solubilizar o cristal violeta cristalizado nos biofilmes, em cada poço foi adicionado 200µL de etanol 99% e após a solubilização, um volume de 100µL desta solução de cada poço foi transferida para uma nova microplaca, respeitando a mesma ordem dos poços, dos isolados da placa inicial.

Em seguida procedeu-se a leitura da absorbância a 575nm, quantificando a densidade óptica referente a capacidade de formação dos biofilmes dos isolados em cada poço. Os biofilmes contrastantes com relação à capacidade de formação de biofilmes foram preparados para visualização em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para esse procedimento os isolados selecionados foram

submetidos à formação de biofilme em lâminas circulares de vidro 13mm de diâmetro (Glasscyto<sup>®</sup>), adaptado a partir de Koo *et al.* (2002) e Barbieri *et al.* (2007).

Os biofilmes foram desenvolvidos em lâminas de vidro inseridas em tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo BHI sacarosado (5%) previamente autoclavados. Nesse sistema, foi adicionado com técnica asséptica, 0,25mL do inóculo selecionado e padronizado ( $10^7$  células). Para *S. mutans* os sistemas foram incubados a 37°C por 48 horas sob microaerofilia em jarra de Gaspak. Como controle negativo foi utilizado solução de gluconato de clorexidine a 0,12% adicionado ao meio de cultura.

Após o período de incubação os biofilmes formados nas lâminas de vidro foram lavados com Tampão Fosfato Salino (PBS) para a liberação das células fracamente aderidas. Em seguida as lâminas foram preparadas para microscopia eletrônica de varredura. Os reagentes e soluções utilizados nas etapas metodológicas estão apresentados no (APÊNDICE 3).

#### 4.8.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os biofilmes cultivados em lâminas circulares de vidro foram fixados com solução Karnovisk por 24 horas, lavados três vezes com tampão cacodilato (0.05M/ pH 7,4), desidratados numa série crescente de concentrações de álcool etílico (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, e 100%) e secos ao ar ambiente.

Em seguida as amostras foram submetidas ao ponto crítico de CO<sub>2</sub> (Balzers CPD-010) e metalizadas (Balzers SCD-030). A observação foi efetuada no microscópio eletrônico de varredura Philips SEM 505. As amostras foram analisadas no Centro de Microscopia Eletrônica, UFPR-PR, Brasil.

#### 4.8.2 Microscopia de Fluorescência Confocal

Para a visualização da estrutura da matriz exopolissacarídica (EPS) e células dos biofilmes, pela técnica de microscopia de fluorescência confocal, os micro-organismos foram cultivados em caldo BHI com adição de 5% de sacarose, em placas de poliestireno 35mm de diâmetro com uma fenda no centro contendo uma lamínula de vidro colada (MatTek Corporation, Ashland, MA, EUA), à 37°C por

48 h sob microaerofilia, com uso de Jarra de Gaspac, sendo adicionado ao meio de cultura o marcador fluorescente dextram sulfato, conjugado com Alexa Fluor 647 (peso molecular 10kDa; excitação/emissão = 647/668nm da Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) na concentração de 2,0 $\mu$ M, baseado em Klein *et al.* (2009) e Xiao *et al.* (2012).

Para marcar as células leveduriformes e bacterianas que constituíam o biofilme, após o cultivo procedeu-se duas lavagens, de forma delicada, do biofilme formado sobre a superfície da lamínula utilizando tampão PBS (pH 7,4). Em seguida era realizada a fixação dos mesmos com álcool etílico 50% *over night* a 4°C. Após este período, o álcool foi removido e as amostras de biofilme foram novamente lavadas suavemente por duas vezes com tampão PBS. Em seguida foi adicionado no interior das placas o marcador fluorescente SYTOX Green Nucleic Acid Stain (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) excitação/emissão = 504/523nm, na concentração final de 2,5 $\mu$ M em tampão PBS com 0,01% de saponina, baseado em Thurnheer *et al.* (2001) com modificações.

As imagens foram produzidas no microscópio confocal Nikon A1 (NIKON, Tokyo, Japan) utilizando objetivas de imersão 100X (com abertura numérica de 1,45). Para Alexa Fluor 647 o laser de excitação foi de 639nm, e a emissão utilizou filtro de intervalo ("band pass") entre 662,5 a 737,5 (700/75). Para a detecção da marcação com SYTOX Green foi utilizado laser 488 para excitação e filtro de intervalo ("band pass") de 500-550nm. As amostras de biofilmes foram escaneadas em 3 posições ao acaso, e a série de imagens (em Z) foi gerada por sessões ópticas para cada posição. O programa Imaging Software Nis Elements 4.20 (NIKON, Tokyo Japan) foi utilizado para a visualização das imagens.

#### 4.8.3 Análise estatística

Os experimentos de formação de biofilmes foram realizados em triplicata e os dados originais foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) com delineamento inteiramente casualizado. A ANOVA foi complementada por teste Tukey com nível de significância de 5% para a comparação entre as médias, utilizando o programa Assistat, versão 7.6 beta.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*: ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E PRODUÇÃO DE BIOFILME *IN VITRO*

A partir de amostras de saliva e biofilme dental de um total de 38 crianças investigadas, constatou-se que 12 crianças eram coinfectadas por leveduras do gênero *Candida* e pela bactéria *S. mutans*. Destas 12 crianças coinfectadas foram recuperados 31 isolados de leveduras do gênero *Candida*. Inicialmente foi realizada a identificação presuntiva destes isolados em meio cromogênico.

Os meios cromogênicos são rotineiramente utilizados para a identificação presuntiva de leveduras do gênero *Candida*, reduzindo o tempo de identificação e proporcionando orientação terapêutica (COOKE *et al.*, 2002; QUINDÓS *et al.*, 2001). Entretanto, algumas espécies são discriminadas somente por caracterização molecular.

No presente estudo, dos 31 isolados identificados presuntivamente como *C. albicans* pelo meio cromogênico, 05 (16,12%) pertenciam a outras espécies de acordo com a identificação molecular.

Do Carmo Oliveira *et al.* (2006) compararam a identificação de 52 isolados clínicos de *Candida* spp. em meio cromogênico e por caracterização molecular. Das amostras testadas, os autores verificaram que 65,4% apresentaram resultados discrepantes e 11,5% dos isolados não foram identificados. Martins *et al.* (2010) compararam o meio cromogênico com a identificação molecular e verificaram que para a espécie *C. albicans* 16% dos isolados não foram identificados pelo meio cromogênico.

Na tabela 7 foram relacionados os isolados de leveduras do gênero *Candida* identificados por meio do sequenciamento das regiões ITS e domínios variáveis D1/D2. Foram identificados 26 isolados de *C. albicans* (83,87%) e 05 de *Candida* não-albicans (16,12%), sendo entre esses 03 isolados de *C. tropicalis* (9,68%), 01 de *C. glabrata* (3,22%) e 01 de *C. guilliermondii* (3,22%).



**TABELA 7 - ISOLADOS DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida* OBTIDAS A PARTIR DE AMOSTRAS SALIVARES E DE BIOFILME DENTAL**

Identificação	Coleção de Cultura	Número de Acesso Genbank*		Fonte	Localização Geográfica
		ITS	D1/D2		
<i>Candida albicans</i>	LMICRO501	KF746414	KF746387	Biofilme Dental	Brasil
<i>Candida albicans</i>	LMICRO502	KF746415	KF746390	Saliva	Brasil
<i>Candida albicans</i>	LMICRO503	KF746432	KF746409	Biofilme Dental	Brasil
<i>Candida albicans</i>	LMICRO504	-	KF746410	Saliva	Brasil
<i>Candida albicans</i>	LMICRO505	-	KF746411	Biofilme Dental	Brasil
<i>Candida albicans</i>	LMICRO506	-	KF746412	Biofilme Dental	Brasil
<i>Candida albicans</i>	LMICRO507	KF746423	-	Biofilme Dental	Brasil
<i>Candida albicans</i>	LMICRO508	-	KF746413	Biofilme Dental	Brasil
<i>Candida albicans</i>	LMICRO509	-	KF746388	Biofilme Dental	Brasil
<i>Candida albicans</i>	LMICRO510	-	KF746395	Saliva	Brasil
<i>Candida albicans</i>	LMICRO512	KF746424	KF746396	Biofilme Dental	Brasil
<i>Candida albicans</i>	LMICRO513	KF746425	KF746397	Biofilme Dental	Brasil
<i>Candida albicans</i>	LMICRO514	-	KF746389	Biofilme Dental	Brasil
<i>Candida albicans</i>	LMICRO515	KF746426	KF746398	Biofilme Dental	Brasil
<i>Candida albicans</i>	LMICRO516	KF746427	KF746399	Saliva	Brasil
<i>Candida albicans</i>	LMICRO517	-	KF746400	Biofilme Dental	Brasil
<i>Candida albicans</i>	LMICRO518	-	KF746401	Biofilme Dental	Brasil
<i>Candida albicans</i>	LMICRO519	KF746428	KF746402	Biofilme Dental	Brasil
<i>Candida albicans</i>	LMICRO520	KF746429	KF746403	Biofilme Dental	Brasil
<i>Candida albicans</i>	LMICRO521	-	KF746404	Biofilme Dental	Brasil
<i>Candida tropicalis</i>	LMICRO522	KF746430	KF746405	Biofilme Dental	Brasil
<i>Candida albicans</i>	LMICRO523	KF746431	KF746406	Biofilme Dental	Brasil
<i>Candida tropicalis</i>	LMICRO524	KF746416	KF746391	Saliva	Brasil
<i>Candida albicans</i>	LMICRO525	KF746417	-	Biofilme Dental	Brasil
<i>Candida albicans</i>	LMICRO526	-	KF746407	Biofilme Dental	Brasil
<i>Candida tropicalis</i>	LMICRO527	-	KF746408	Saliva	Brasil
<i>Candida albicans</i>	LMICRO528	KF746418	-	Biofilme Dental	Brasil
<i>Candida glabrata</i>	LMICRO529	KF746419	KF746392	Biofilme Dental	Brasil
<i>Candida albicans</i>	LMICRO530	KF746420	-	Biofilme Dental	Brasil
<i>Candida albicans</i>	LMICRO531	KF746421	KF746393	Saliva	Brasil
<i>Candida guilliermondii</i>	LMICRO532	KF746422	KF746394	Saliva	Brasil

FONTE: O AUTOR (2014)

NOTA: (\*) NÚMERO DE ACESSO DAS SEQUÊNCIAS ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

O estudo da prevalência de leveduras do gênero *Candida* na microbiota bucal de humanos é importante para o entendimento da frequência de colonização

de organismos oportunistas com capacidade de formação de biofilme identificando reservatórios de potenciais agentes infecciosos (HOFLING *et al.*, 2011).

De um total de 38 crianças envolvidas neste estudo, 12 delas eram colonizadas por leveduras do gênero *Candida* (31,57%). Esta prevalência corrobora com outros estudos epidemiológicos, embora existam variações na distribuição destas leveduras dependendo de cada grupo populacional analisado.

Kleinegger *et al.* (1996) analisando a prevalência de *C. albicans* em diferentes idades, em Iowa, EUA, observou que a frequência de portadores de leveduras do gênero *Candida* era de 40 %. Em um estudo realizado na localidade de Ghaziabad, na Índia por Rozkiewicz *et al.* (2006) investigando a ocorrência de *C. albicans* em amostras bucais de crianças saudáveis foi observado que 40% destas eram colonizadas pela levedura.

No Brasil, Moreira *et al.* (2001), investigando a ocorrência de espécies de *Candida* em amostras de saliva de crianças pertencentes a diferentes classes socioeconômicas encontraram uma taxa de 47,3% de portadores. Os autores reportaram que entre o total de isolados, 5% foram identificados como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, associadas à colonização por *C. albicans*. Komiyama *et al.* (2004), em um estudo realizado na região de São José dos Campos/SP, Brasil, relataram a prevalência de *Candida* spp. na microbiota oral de crianças tratadas com corticosteróides inalados, observando uma colonização de 43,33% em relação ao grupo controle (30%).

Estes relatos corroboram com os resultados obtidos neste trabalho, indicando a existência de indivíduos multicolonizados por espécies de *Candida*. Tais resultados demonstram que essas espécies provavelmente podem ser encontradas em crianças saudáveis.

Há algumas décadas as infecções e candidoses eram quase que exclusivamente associadas à espécie *C. albicans*, porém o aumento do número de infecções causadas por espécies não-albicans tem sido observado a partir do avanço das técnicas de identificação, revelando características epidemiológicas de relevância clínica (TROFA *et al.*, 2008; KOTHAVADE *et al.*, 2010).

O aumento da prevalência de espécies não-albicans como colonizadoras comensais na microbiota humana em diferentes nichos, tem sido associada aos altos índices de mortalidade e morbidade nas infecções causadas por estes agentes

(COLOMBO e GUIMARÃES, 2003; MCCULLOUGH; CLEMONS; STEVENS, 1999; MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

Neste trabalho, além dos isolados de *C. albicans* foram obtidos isolados de *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. guilliermondii* (TABELA 8). A espécie *C. tropicalis* é apontada como a principal espécie de leveduras não-albicans associada à candidemias, principalmente em pacientes imunossuprimidos. Estudos recentes sobre a virulência desta espécie têm demonstrado a presença de proteinases, fosfolipases e capacidade de formação de biofilme (KOTHAVADE *et al.*, 2010).

O conhecimento da prevalência e distribuição de diferentes espécies de leveduras do gênero *Candida* em crianças saudáveis é um fator importante do ponto de vista epidemiológico para o monitoramento do risco de infecções entre diferentes grupos. Gouvea-Mondin e Hoflling (2005) investigaram o papel da colonização por leveduras do gênero *Candida* associada à etiologia da cárie dentária em crianças. Os autores ressaltaram a importância deste estudo para inferências a respeito da taxonomia, epidemiologia e patogenicidade desses agentes.

As crianças coinfectadas por leveduras do gênero *Candida* e pela bactéria *S. mutans* avaliadas no presente estudo, apresentaram índices da doença cárie para dentes permanentes (CPOD) entre 0 e 4 e para dentes decíduos (ceo) entre 0 e 3, com uma concentração média de *S. mutans* na saliva de  $2,07 \times 10^4$  UFC/mL e de leveduras do gênero *Candida* em torno de  $1,93 \times 10^2$  UFC/mL. Das doze (12) crianças coinfectadas, nove (09) delas (75%) tinham índice de cárie (CPO-D/ ceo) maior que zero indicando histórico de ocorrência da doença, e oito (08) delas (66%) apresentavam lesão ativa no momento da coleta. Na tabela 8 foram sumarizados os dados clínicos e epidemiológicos das crianças coinfectadas por leveduras do gênero *Candida*.

De acordo com os dados apresentados na tabela 8, todas as crianças coinfectadas eram portadoras de pelo menos uma linhagem de *C. albicans*, enquanto que quatro crianças eram colonizadas também por pelo menos uma das espécies *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. guilliermondii*.

**TABELA 8 - DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DAS CRIANÇAS COINFECTADAS POR LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida***

Criança ID	Histórico de Cárie		Atividade de Cárie	S. mutans UFC/mL de saliva	Candida spp. UFC/mL de saliva	Isolados	Genótipo ABC	Biofilme (ABS/575nm)
	CPO-D	ceo-d						
1(3)	1	1	Sim	6,8x10 <sup>3</sup>	1,63x10 <sup>2</sup>	<i>Candida albicans</i> LMICRO518	A	0,7498
						<i>Candida albicans</i> LMICRO531	A	0,0759
2(4)	2	1	Não	7,3x10 <sup>3</sup>	1,42x10 <sup>2</sup>	<i>Candida albicans</i> LMICRO513	B	1,2074
						<i>Candida albicans</i> LMICRO519	A	1,1204
						<i>Candida albicans</i> LMICRO506	B	1,0989
3(5)	3	1	Sim	5,2x10 <sup>5</sup>	1,12x10 <sup>2</sup>	<i>Candida albicans</i> LMICRO504	B	0,3159
						<i>Candida albicans</i> LMICRO514	B	0,9803
						<i>Candida albicans</i> LMICRO526	A	1,1338
4(8)	0	0	Não	5,2x10 <sup>3</sup>	2,98x10 <sup>2</sup>	<i>Candida albicans</i> LMICRO503	B	0,7403
						<i>Candida albicans</i> LMICRO509	B	1,2896
5(10)	0	0	Não	8,3x10 <sup>4</sup>	2,45x10 <sup>2</sup>	<i>Candida albicans</i> LMICRO501	B	1,4046
						<i>Candida albicans</i> LMICRO515	B	1,0954
						<i>Candida albicans</i> LMICRO525	A	1,1748
6(11)	0	0	Não	6,7x10 <sup>4</sup>	1,48x10 <sup>2</sup>	<i>Candida albicans</i> LMICRO502	B	1,1987
						<i>Candida albicans</i> LMICRO508	B	0,0760
						<i>Candida albicans</i> LMICRO510	B	0,9731
7(12)	2	2	Sim	4,6x10 <sup>5</sup>	1,80x10 <sup>2</sup>	<i>Candida albicans</i> LMICRO517	B	1,0921
						<i>Candida albicans</i> LMICRO530	A	0,4980
						<i>C. guilliermondii</i> LMICRO532	-	0,0742
8(22)	3	2	Sim	4,8x10 <sup>5</sup>	2,20x10 <sup>2</sup>	<i>Candida albicans</i> LMICRO516	B	0,0757
						<i>Candida glabrata</i> LMICRO529	-	1,0430
9(27)	4	2	Sim	7,4x10 <sup>4</sup>	3,30x10 <sup>2</sup>	<i>Candida tropicalis</i> LMICRO524	-	0,0756
						<i>Candida tropicalis</i> LMICRO527	-	0,5225
						<i>Candida albicans</i> LMICRO512	B	1,0245
10(31)	0	3	Sim	4,2x10 <sup>5</sup>	1,30x10 <sup>2</sup>	<i>Candida albicans</i> LMICRO507	A	1,0469
						<i>Candida albicans</i> LMICRO523	A	1,2485
11(32)	4	3	Sim	5,4x10 <sup>4</sup>	2,1x10 <sup>2</sup>	<i>Candida tropicalis</i> LMICRO522	-	1,0547
						<i>Candida albicans</i> LMICRO528	A	0,8910
						<i>Candida albicans</i> LMICRO505	A	1,1450
12(35)	1	2	Sim	5,9x10 <sup>5</sup>	1,4x10 <sup>2</sup>	<i>Candida albicans</i> LMICRO520	A	1,2252
						<i>Candida albicans</i> LMICRO521	A	0,9400

FONTE: O AUTOR (2014)

NOTA: OS NÚMEROS APRESENTADOS ENTRE PARÊNTESES CORRESPONDEM A IDENTIFICAÇÃO INICIAL DE TODAS AS CRIANÇAS INCLUÍDAS NO ESTUDO (n=38) APRESENTADOS NO APÊNDICE 8. CPO-D: ÍNDICE REFERENTE AO NÚMERO DE DENTES CARIADOS, EXTRAÍDOS E RESTAURADOS PARA A DENTIÇÃO PERMANENTE. ceo-d: ÍNDICE REFERENTE AO NÚMERO DE DENTES CARIADOS, EXTRAÍDOS POR CÁRIE E RESTAURADOS PARA A DENTIÇÃO DECÍDUA.

As crianças portadoras de espécies não-albicans apresentaram os maiores índices de cárie, principalmente as colonizadas pela espécie *C. tropicalis*. Tais resultados sugerem que as espécies não-albicans podem estar relacionadas com mudanças na microbiota que aumentam o risco da doença. Além disso, o fato de todas as crianças serem colonizadas por *C. albicans* sugere uma associação desta espécie na formação do biofilme potencialmente cariogênico.

Quanto a frequência de isolamento, considerando as 12 crianças multicolonizadas e os 31 isolados recuperados, observou-se que os 26 isolados da espécie *C. albicans* representavam 83,87% do isolamento sendo que entre esses 12

pertenciam ao genótipo A (46,15%) e 14 ao genótipo B (53,84%). Com relação às espécies não-albicans, *C. tropicalis* representava 9,68% com 03 isolados, *C. glabrata* representava 3,22% com 01 isolado, assim como *C. guilliermondii*.

Entre os isolados de *C. albicans*, dois diferentes genótipos foram observados, através do sistema ABC, sendo que 12 isolados pertenciam ao genótipo A e 14 ao genótipo B. Os isolados do genótipo A foram mais frequentes nas crianças com histórico de cárie, ocorrendo em 77% delas. Dos oito isolados de *C. albicans* provenientes de crianças sem histórico de cárie (CPO-D e ceo-d =0), sete (87,5%) eram do genótipo B e apenas um isolado do genótipo A. Em relação a atividade de cárie observou-se que o genótipo B também era mais o prevalente nas crianças sem lesão ativa, com nove isolados do genótipo B representando 81,8% e apenas dois isolados do genótipo A. Sendo assim, observou-se que embora o genótipo B tenha ocorrido em crianças com atividade de cárie, estes eram prevalentes nas crianças com ausência da lesão (TABELA 8). Tais resultados reforçam a relação do genótipo A com a manifestação clínica da doença.

A multicolonização do hospedeiro, diferentes genótipos e espécies encontradas parecem ter uma relação expressiva com o desenvolvimento da cárie dental. Comparando a capacidade de produção de biofilme *in vitro* entre os genótipos A e B de *C. albicans* observou-se, considerando os valores de leitura de absorbância, que os dois genótipos apresentavam variações na concentração de células aderidas durante a formação do biofilme *in vitro* (TABELA 8).

De acordo com os resultados, verificou-se uma variação da absorbância relacionada às células aderidas no biofilme entre 0,076 a 1,24 para os isolados de *C. albicans* do genótipo A e de 0,076 a 1,41 para o genótipo B. Enquanto que, para os isolados das espécies não-albicans foram observados valores de absorbância entre 0,074 a 1,051, indicando uma discreta redução na formação de biofilme *in vitro* em relação à espécie *C. albicans* (TABELA 8).

Poucos estudos relatam a distribuição dos genótipos de *C. albicans* determinados pelo sistema ABC, em crianças saudáveis associando essa informação com o histórico e atividade de cárie. Qi, Hu e Zhou (2005) avaliaram a distribuição dos genótipos ABC na microbiota bucal de crianças chinesas saudáveis e verificaram que o genótipo A foi o mais prevalente, porém os resultados se referem apenas à distribuição dos genótipos sem apresentar correlação com atividade e ou histórico de cárie. Yang *et al.* (2012) verificaram a ocorrência do genótipo A em

crianças de 3 a 6 anos com cárie severa. Nesse contexto, estudos que caracterizem linhagens presentes de uma determinada população podem auxiliar na identificação de grupos de risco ao desenvolvimento e/ou esclarecer o curso de evolução da doença.

Portanto, a investigação dos genótipos ABC de *C. albicans* deve ser um fator epidemiológico a ser explorado. Os resultados obtidos no presente estudo sugerem uma forte correlação entre histórico de cárie em crianças portadoras de *C. albicans* genótipo A. Enquanto que, as crianças sem atividade de cárie eram predominantemente colonizadas pelo genótipo B. Além disso, foi verificado que duas crianças (ID 8 e 9) apresentavam atividade de cárie e não eram portadoras de *C. albicans* do genótipo A, porém essas apresentavam as espécies *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Tais resultados indicam a necessidade de uma investigação mais abrangente para elucidar a prevalência de determinado genótipo e sua relação com a atividade de cárie.

De acordo com a análise filogenética, com base nas sequências das regiões ITS e D1/D2 do gene rDNA, verificou-se que os isolados do gênero *Candida*, obtidos de amostras de saliva e biofilme, apresentavam variabilidade tanto inter quanto intra-específica. Os isolados das diferentes espécies (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. glabrata*) foram distribuídos em diferentes clados (FIGURA 3).

No clado *C. albicans*, foi observado que a maioria dos isolados era procedente de diferentes crianças, com formação de subgrupos, indicando a existência de variabilidade genética entre eles. Também foi observada variabilidade entre os isolados de *C. albicans* procedentes de um mesmo indivíduo. Por exemplo, a criança identificada pelo número 2 era colonizada por diferentes isolados distribuídos em subclados, assim como, as crianças identificadas pelos números 1, 3, 5, 6 e 10. De acordo com a análise filogenética observou-se que dos oito isolados de *C. albicans* provenientes de crianças sem histórico de cárie, apenas um era *C. albicans* do genótipo A os demais eram do genótipo B



**FIGURA 3- ÁRVORE FILOGENÉTICA DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA BASEADA NO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS1/ITS2 DO GENE rDNA, CONSTRUÍDA COM 1000 REPETIÇÕES DE BOOTSTRAP, USANDO O MODELO EVOLUTIVO KIMURA 2 PARÂMETROS.**

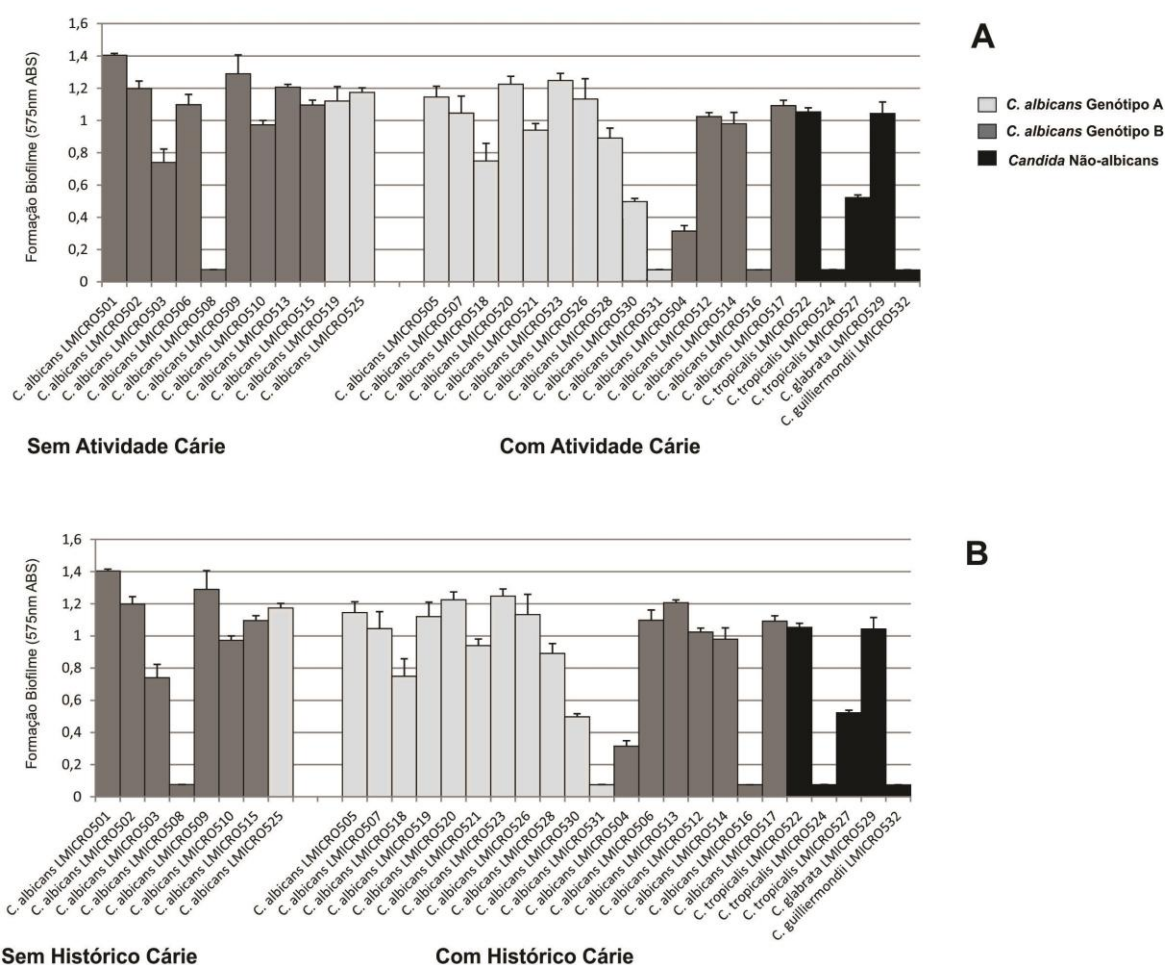
FONTE: O AUTOR (2014)

NOTA: *Schizosaccharomyces pombe* FOI UTILIZADO COMO GRUPO EXTERNO. OS NÚMEROS DE 1 A 12 REPRESENTAM AS CRIANÇAS COINFECTADAS. PRODUÇÃO DE BIOFILME EM ABSORBÂNCIA 575NM: 1,2 - 1,4 (++++); 1,0 - 1,2 (++++); 0,8 - 1,0 (+++); 0,3 - 0,5 (++); 0,0 - 0,2 (+). ÍNDICE DE CÂRIE: ■ SEM CÂRIE; ■ UM OU DOIS DENTES CARIADOS; ■ TRÊS OU QUATRO DENTES CARIADOS; ■ CINCO OU MAIS DENTES CARIADOS. GENÓTIPOS DO SISTEMA ABC: GENÓTIPOS A OU B.

A partir da distribuição dos isolados ao longo dos diferentes clados associados aos dados epidemiológicos confirmou-se a evidente correlação entre histórico de cárie e o genótipo A de *C. albicans* (FIGURA 3). Além disso, foi observado que apesar da baixa frequência de isolados pertencentes às espécies não-albicans, todas as crianças portadoras dessas linhagens possuíam alto histórico de cárie, sugerindo que essas espécies podem estar relacionadas com importantes mudanças na microbiota e desenvolvimento da doença.

Tais resultados corroboram com o anteriormente relatado por Yang *et al.* (2012), onde os autores verificaram a associação entre o genótipo A e a manifestação clínica da doença.

Na figura 4 foram apresentados os resultados da capacidade de formação de biofilme *in vitro* dos isolados de leveduras do gênero *Candida*.



**FIGURA 4 - FORMAÇÃO DE BIOFILMES *IN VITRO* DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida* A 575nm.**

FONTE: O AUTOR (2014)



NOTA: **A**- ISOLADOS OBTIDOS DE CRIANÇAS COM E SEM ATIVIDADE DE CÁRIE; **B**- ISOLADOS OBTIDOS DE CRIANÇAS COM E SEM HISTÓRICO DE CÁRIE. ANOVA DAS MÉDIAS DE CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME ENTRE TODOS OS ISOLADOS FOI CONSIDERADA SIGNIFICANTE ( $P < 0,01$ ); A MÚLTIPLA COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS GRUPOS ANALISADOS DE ACORDO COM TESTE TUKEY NÃO APRESENTOU SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA ( $P > 0,05$ ).

As diferenças nos padrões de aderência entre os isolados foram observadas independentemente da espécie e origem do isolado. De acordo com a análise estatística (ANOVA) verificou-se diferenças significativas entre os valores médios de absorbância ( $p \leq 0.001$ ). Entretanto, não foi encontrada correlação entre a habilidade de formação de biofilme *in vitro* de cada isolado e atividade de cárie considerando  $p > 0.05$  (FIGURA 4-A) e da mesma forma para o histórico da doença (FIGURA 4-B). As análises estatísticas estão apresentadas nos APÊNDICES 4, 5 e 6.

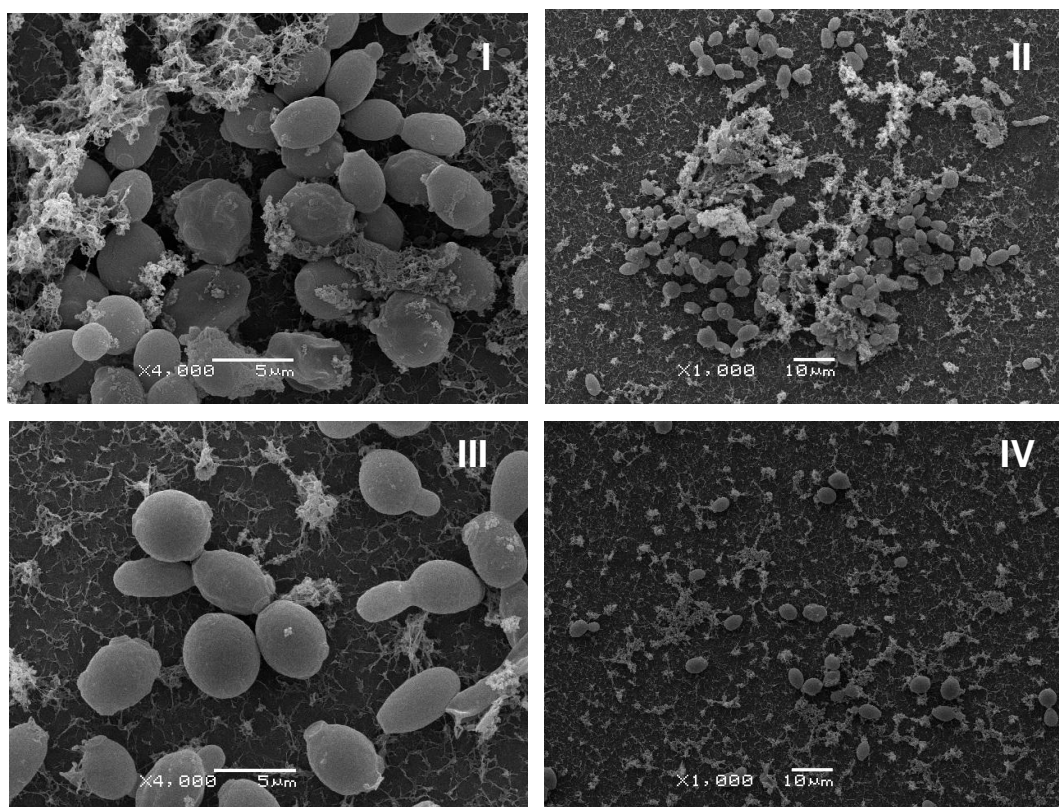
Essa análise sugere que a manifestação clínica da doença não decorre de um fator isoladamente, porém a interação entre as espécies e genótipos que colonizam o biofilme parece ser o fator relevante para o estabelecimento do biofilme cariogênico.

Estudos que investigam a associação de leveduras do gênero *Candida* e a manifestação clínica da doença cárie sugerem que a presença da levedura representa um fator adicional para o aumento da colonização e expressão da virulência de *S. mutans* (SEN; KAMRAN; LARS, 1997; AKDENIZ *et al.*, 2002; BARBIERI *et al.*, 2007, GREGOIRE *et al.*, 2011).

Gregoire *et al.* (2011) estudaram o papel da enzima GTF-B na coagregação de *C. albicans* com *S. mutans* e sugeriram que a interação sacarose-dependente mediada pela enzima GTF-B desencadeia a formação de glucanos, que se ligam à parede celular da levedura intensificando a produção de matriz extracelular e consequentemente favorecendo o desenvolvimento de *S. mutans*, isso explicaria o aumento da concentração de *S. mutans* em microbiotas portadoras da levedura e o consequente aumento do risco à cárie.

A figura 4 representa a variação na capacidade de produção de biofilme entre os isolados do gênero *Candida*. Entre os isolados das espécies não-albicans, os três isolados de *C. tropicalis* tiveram padrão variável de aderência, enquanto que *C. glabrata* apresentava maior capacidade de formação de biofilme *in vitro* e o isolado de *C. guilliermondii* apresentava capacidade reduzida.

Na figura 5 observam-se micrografias eletrônicas de varredura de amostras representativas de dois diferentes padrões de formação de biofilme *in vitro* exibidos por isolados de *C. albicans* pertencentes ao genótipo A. O biofilme produzido pelo isolado de *C. albicans* LMICRO523 (FIGURA 5I-II) mostra maior densidade que quando comparado com a amostra de biofilme do isolado de *C. albicans* LMICRO530 (FIGURA 5III-IV).



**FIGURA 5 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DE AMOSTRAS REPRESENTATIVAS DE BIOFILMES DE ISOLADOS DE *C. albicans*.**  
FONTE: O AUTOR (2014)

NOTA: **I E II-** FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *C. albicans* (ISOLADO LMICRO523 – GENÓTIPO A) APÓS 24 HORAS DE CULTIVO EM CALDO BHI SACAROSADO 5%; **III E IV-** FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *C. albicans* (ISOLADO LMICRO530 – GENÓTIPO A) APÓS 24H DE CULTIVO EM CALDO BHI SACAROSADO 5%.

## 5.2 ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E PRODUÇÃO DE BIOFILME *IN VITRO* POR *Streptococcus mutans*

Um total de 83 isolados de *S. mutans* procedentes de saliva e biofilme dental das 38 crianças participantes deste estudo foram identificados presuntivamente por meio da morfologia colonial após cultivo em AMSB (GOLD; JORDAN; VAN HOUTE, 1973) e provas bioquímicas (HOLT *et al.*, 1994). Os resultados da caracterização

morfológica e bioquímica dos isolados e *S. mutans* foram apresentados no (APÊNDICE 7). A estimativa de *S. mutans* e leveduras do gênero *Candida* na saliva e os dados epidemiológicos das crianças avaliadas (n=38) foram apresentados no apêndice 8. Durante o isolamento observou-se que 12 crianças eram coinfectadas por leveduras do gênero *Candida*.

Com base na capacidade de produção de biofilmes dos 83 isolados de *S. mutans* foram selecionados 12 isolados provenientes das crianças coinfectadas com leveduras do gênero *Candida* e 08 isolados procedentes de crianças não coinfectadas. Os dados utilizados para esta seleção foram apresentados no apêndice 9.

Os 20 isolados de *S. mutans* selecionados foram analisados molecularmente através do sequenciamento da região parcial dos genes *Gtf-B* e *HtrA* e as sequências obtidas foram depositadas no banco de dados Genbank-NCBI: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). (TABELA 9).

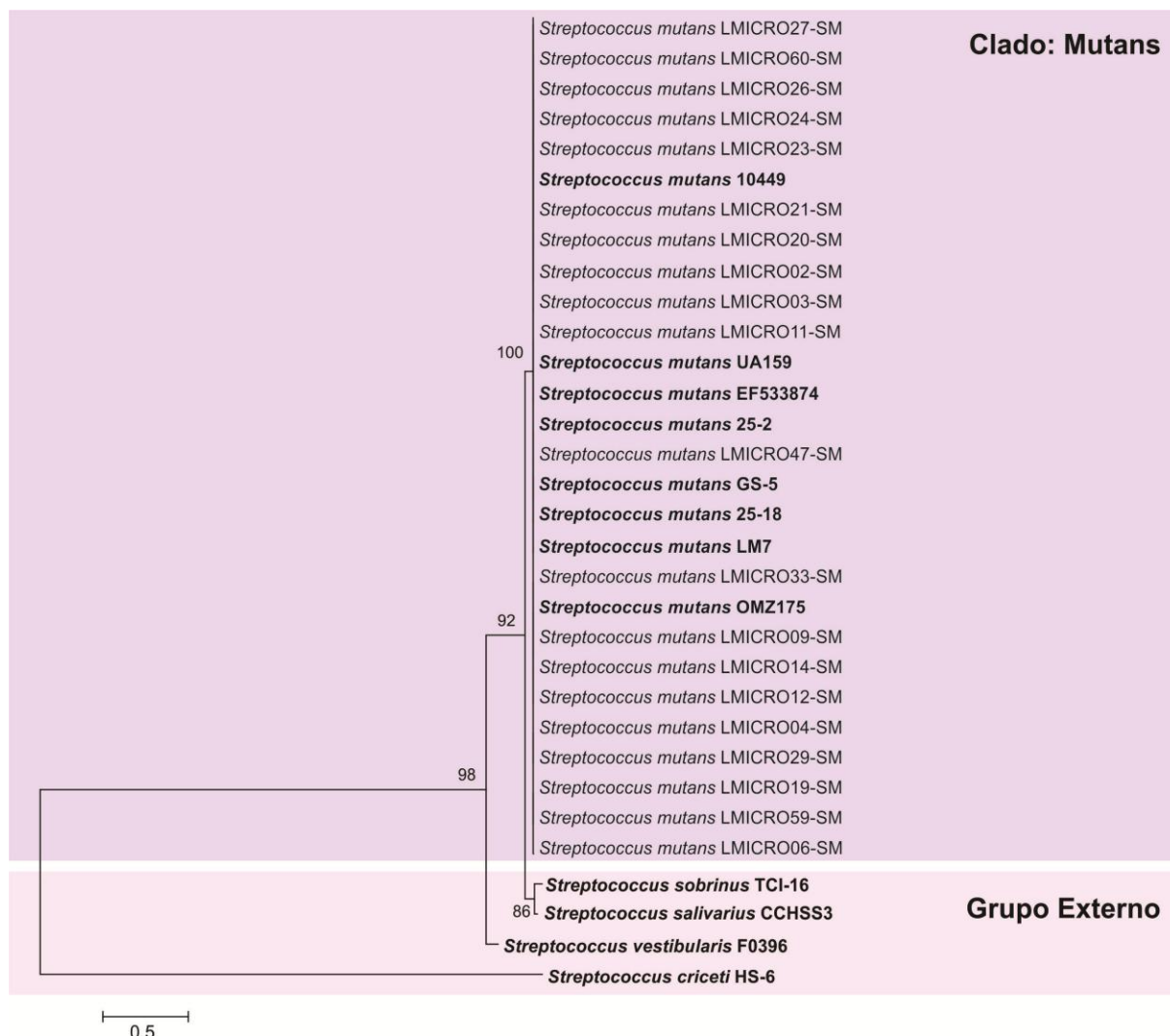
**TABELA 09** - ISOLADOS DE *S. mutans* OBTIDOS A PARTIR DE AMOSTRAS SALIVARES E DE BIOFILME DENTAL DE CRIANÇAS MORADORAS NA CIDADE DE CURITIBA, PARANÁ, BRASIL

Identificação	Coleção de Cultura	Número de Acesso Genbank		Fonte	Localização Geográfica
		<i>gtf-B</i>	<i>HtrA</i>		
<i>Streptococcus mutans</i>	LMICRO02-SM	-(*)	KJ767152	Biofilme Dental	Brasil
<i>Streptococcus mutans</i>	LMICRO03-SM	KJ767147	KJ767153	Saliva	Brasil
<i>Streptococcus mutans</i>	LMICRO04-SM	KJ767146	KJ767154	Biofilme Dental	Brasil
<i>Streptococcus mutans</i>	LMICRO06-SM	KJ767148	KJ767155	Saliva	Brasil
<i>Streptococcus mutans</i>	LMICRO09-SM	-(*)	KJ767150	Biofilme Dental	Brasil
<i>Streptococcus mutans</i>	LMICRO11-SM	KJ767149	KJ767156	Biofilme Dental	Brasil
<i>Streptococcus mutans</i>	LMICRO12-SM	KJ767140	KJ767157	Biofilme Dental	Brasil
<i>Streptococcus mutans</i>	LMICRO14-SM	KJ767132	KJ767151	Biofilme Dental	Brasil
<i>Streptococcus mutans</i>	LMICRO19-SM	KJ767133	KJ767158	Biofilme Dental	Brasil
<i>Streptococcus mutans</i>	LMICRO20-SM	KJ767134	KJ767159	Saliva	Brasil
<i>Streptococcus mutans</i>	LMICRO21-SM	KJ767141	KJ767160	Biofilme Dental	Brasil
<i>Streptococcus mutans</i>	LMICRO23-SM	KJ767142	KJ767161	Biofilme Dental	Brasil
<i>Streptococcus mutans</i>	LMICRO24-SM	KJ767135	KJ767162	Biofilme Dental	Brasil
<i>Streptococcus mutans</i>	LMICRO26-SM	KJ767143	KJ767163	Biofilme Dental	Brasil
<i>Streptococcus mutans</i>	LMICRO27-SM	KJ767136	KJ767164	Saliva	Brasil
<i>Streptococcus mutans</i>	LMICRO29-SM	KJ767144	KJ767165	Biofilme Dental	Brasil
<i>Streptococcus mutans</i>	LMICRO33-SM	KJ767137	KJ767166	Biofilme Dental	Brasil
<i>Streptococcus mutans</i>	LMICRO47-SM	KJ767138	KJ767167	Biofilme Dental	Brasil
<i>Streptococcus mutans</i>	LMICRO59-SM	KJ767139	KJ767168	Biofilme Dental	Brasil
<i>Streptococcus mutans</i>	LMICRO60-SM	KJ767131	KJ767169	Biofilme Dental	Brasil

FONTE: O AUTOR (2014)

NOTA: (\*) ISOLADOS COM CÓDIGO DO GENE BANK EM PROGRESSÃO, PROTOCOLO (BANKIT1693513).

A árvore filogenética baseada no sequenciamento da região parcial do gene *Htr-A* utilizando diferentes espécies do gênero *Streptococcus* mostrou que os isolados incluídos nesse estudo agruparam-se dentro de um único clado juntamente com as linhagens referências de *S. mutans* (FIGURA 6).



**FIGURA 6-** ÁRVORE FILOGENÉTICA DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA, MODELO EVOLUTIVO KIMURA 3- PARAMETROS A PARTIR DE SEQUÊNCIAS PARCIAIS DO GENE *Htr-A* DE *S. mutans*

FONTE: O AUTOR (2014)

NOTA: A ANÁLISE DE BOOTSTRAP FOI FEITA COM 1.000 REPETIÇÕES. FOI UTILIZADO COMO GRUPO EXTERNO *S. salivarius*.

Os isolados de *S. mutans* apresentaram variação na capacidade de formação de biofilme *in vitro*. Os dados clínicos, epidemiológicos e formação de biofilme *in vitro* foram sumarizados na tabela 10.

De acordo com o perfil de absorbância verificou-se que a capacidade de formação de biofilme *in vitro* dos isolados de *S. mutans* variava com relação à absorbância entre 0,68 -1,58. A partir da ANOVA constatou-se que esta variação foi considerada estatisticamente significativa, considerando  $p < 0,01$  (TABELA 10). Isolados procedentes de crianças coinfectadas e com alto índice da doença foram os que apresentaram os maiores índices de aderência *in vitro* (LMICRO29-SM; LMICRO09-SM; LMICRO12-SM).

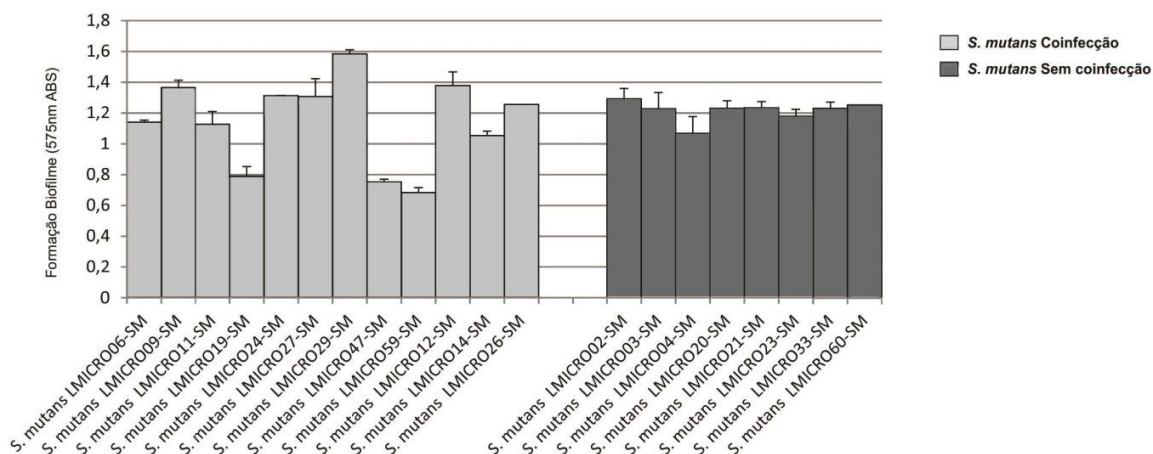
**TABELA 10 - DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA DOENÇA CÁRIE E PRODUÇÃO DE BIOFILME *in vitro* DOS ISOLADOS DE *S. mutans* OBTIDOS DE CRIANÇAS COINFECTADAS E NÃO COINFECTADAS COM LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida***

ID CRIANÇA	ISOLADO	MÉDIAS DO em ABS (575nm)	TESTE DE MÉDIAS	COINF.*	HISTÓRICO		UFC/mL <i>S.mutans</i> SALIVA	ATIVIDADE CÁRIE
					CPO-D	ceo-d		
01(3)	LMICRO06-SM	1,141633	abcde	Sim	1	1	$6,8 \times 10^3$	Sim
02(4)	LMICRO09-SM	1,365533	ab	Sim	2	1	$7,3 \times 10^3$	Não
03(5)	LMICRO11-SM	1,126667	abcde	Sim	3	1	$5,2 \times 10^5$	Sim
04(8)	LMICRO19-SM	0,789967	cde	Sim	0	0	$5,2 \times 10^3$	Não
05(10)	LMICRO24-SM	1,313133	abc	Sim	0	0	$8,3 \times 10^4$	Não
06(11)	LMICRO27-SM	1,306200	abc	Sim	0	0	$6,7 \times 10^4$	Não
07(12)	LMICRO29-SM	1,583533	a	Sim	2	2	$4,6 \times 10^5$	Sim
08(22)	LMICRO47-SM	1,152100	de	Sim	3	2	$4,8 \times 10^5$	Sim
09(27)	LMICRO59-SM	0,684333	e	Sim	4	2	$3,3 \times 10^4$	Sim
10(31)	LMICRO12-SM	1,377700	ab	Sim	0	3	$4,2 \times 10^5$	Sim
11(32)	LMICRO14-SM	1,054167	bcde	Sim	4	3	$5,4 \times 10^4$	Sim
12(35)	LMICRO26-SM	1,255200	abcd	Sim	1	2	$1,4 \times 10^3$	Sim
13(1)	LMICRO02-SM	1,292567	abc	Não	0	1	$2,8 \times 10^3$	Não
14(2)	LMICRO03-SM	1,228433	abcd	Não	0	1	$3,6 \times 10^2$	Não
15(6)	LMICRO04-SM	1,068533	abcde	Não	0	1	$3,6 \times 10^2$	Não
16(9)	LMICRO20-SM	1,230933	abcd	Não	0	0	$5,8 \times 10^2$	Não
17(14)	LMICRO21-SM	1,233633	abcd	Não	3	3	$3,1 \times 10^4$	Sim
18(20)	LMICRO23-SM	1,179267	abcde	Não	3	3	$7,2 \times 10^4$	Sim
19(15)	LMICRO33-SM	0,659267	e	Não	0	0	$2,2 \times 10^3$	Não
20(28)	LMICRO60-SM	0,865133	bcde	Não	1	2	$4,5 \times 10^5$	Sim

\*COINF: COINFEÇÃO. ABS: ABSORBÂNCIA.  
FONTE: O Autor (2014)

NOTA- OS NÚMEROS APRESENTADOS ENTRE PARÊNTESES NA COLUNA 1 CORRESPONDEM A IDENTIFICAÇÃO INICIAL DE TODAS AS CRIANÇAS INCLUÍDAS NO ESTUDO (n=38) APRESENTADOS NO APÊNDICE 8. AS MÉDIAS SEGUIDAS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI. FOI APLICADO O TESTE DE TUKEY AO NÍVEL DE 5% DE PROBABILIDADE (APÊNDICE 10).

Entretanto, a comparação entre as médias de todos os isolados provenientes de crianças coinfectadas e dos isolados procedentes de crianças não coinfectadas não foram significativas pelo teste de Tukey, considerando  $p > 0,05$  (FIGURA 7), devido à variabilidade encontrada no perfil de aderência *in vitro* entre os diferentes isolados. Os resultados da análise estatística dos dados resultantes dessas comparações estão apresentados nos apêndices 10 e 11.



**FIGURA 7 – FORMAÇÃO DE BIOFILMES *IN VITRO* DE ISOLADOS DE *S. mutans* A 575nm**  
 FONTE: O AUTOR (2014)

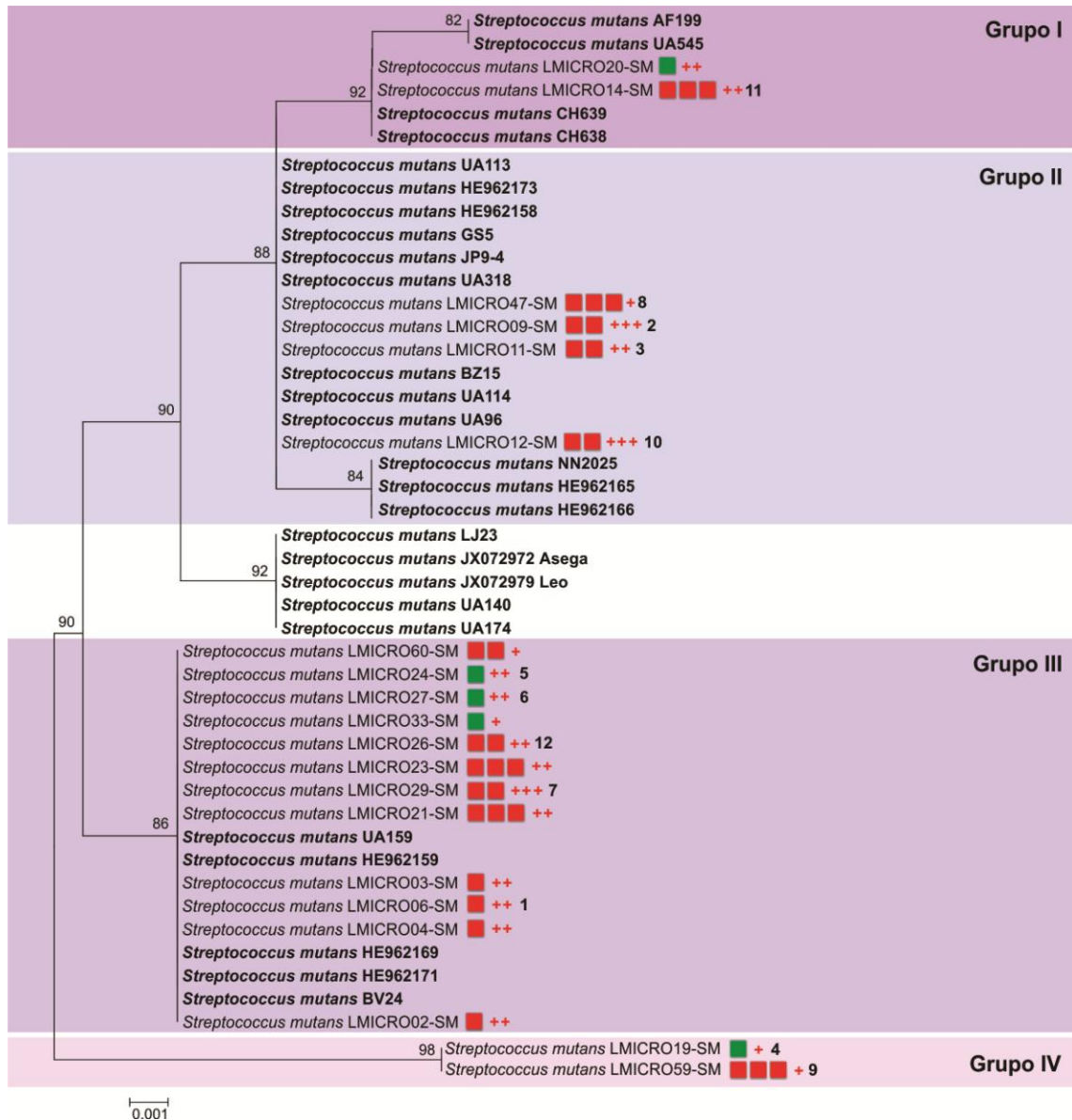
NOTA: AS COLUNAS REPRESENTAM OS ISOLADOS COM OS VALORES MÉDIOS E OS DESVIOS PADRÕES OCORRIDOS NOS ENSAIOS EM TRIPLICATA.

A partir da árvore filogenética baseada no sequenciamento parcial do gene *Gtf-B* construída pelo método neighbor-joining (TAMURA; NEI; KUMAR, 2004) verificou-se que os isolados de *S. mutans* foram distribuídos em quatro grupos geneticamente distintos (FIGURA 8). A diversidade genética observada a partir dos grupos identificados foi associada com os dados de formação de biofilme *in vitro* dos isolados e dados clínicos das crianças coinfectadas e não coinfectadas (TABELA 10) ilustrados na árvore (FIGURA 8).

Dentro dos grupos geneticamente distintos verificou-se variabilidade entre os isolados, os quais também se diferenciavam pela capacidade de formação de biofilme *in vitro*. O grupo I reuniu dois isolados, o LMICRO20-SM obtido de uma criança não coinfectada a qual não apresentava histórico de cárie e o isolado LMICRO14-SM que foi obtido de um hospedeiro coinfectado por *C. albicans* (LMICRO528) e *C. tropicalis* (LMICRO522) que apresentava lesão ativa de cárie e alto histórico da doença. Ambos os isolados apresentavam similar capacidade de



formação de biofilme *in vitro*. Sendo assim, observou-se que a associação entre *S. mutans* e leveduras do gênero *Candida* parece favorecer o desenvolvimento da doença.



**FIGURA 8** - ÁRVORE FILOGENÉTICA NEIGHBOR-JOINING CONSTRUÍDA A PARTIR DE SEQUÊNCIAS PARCIAIS DO GENE *Gtf-B* DE *S. mutans*. UTILIZANDO 1000 REPETIÇÕES DE BOOTSTRAP.

FONTE: O AUTOR (2014)

NOTA: OS NÚMEROS DE 1 A 12 REPRESENTAM AS CRIANÇAS COINFECTADAS. PRODUÇÃO DE BIOFILME EM ABSORBÂNCIA À 575NM: 1,4 – OU MAIS (+++); 1,3 - 1,0 (++) ; 0,8 - 0,0 (++) ; ÍNDICE DE CÁRIE: ■ SEM CÁRIE; ■ UM OU DOIS DENTES CARIADOS; ■ TRÊS OU QUATRO DENTES CARIADOS; ■ CINCO OU MAIS DENTES CARIADOS.

Os contrastes entre a capacidade de formação de biofilme e a expressão clínica da doença cárie se justificam pela habilidade de *S. mutans* se moldar às pressões das diferentes condições ambientais devido aos seus inúmeros fatores de virulência e adaptação conforme relatado em diversos trabalhos (ABRANCHES *et al.*, 2006; AHN; LEMOS; BURNE, 2005, BOWEN; KOO, 2011; KOHLER; KRASSE, 1990; FITZGERALD *et al.*, 1983).

Raja, Hannan e Ali (2010) analisando a associação entre colonização por leveduras do gênero *Candida* e presença de cárie, sugeriram que a colonização pela levedura pode predizer o risco de desenvolvimento da doença.

Gregoire *et al.* (2011) estudaram o papel da expressão da enzima GTF- B em *S. mutans* durante a interação com *C. albicans* em superfície de hidroxiapatita. Os autores observaram uma interação mediada pela enzima GTF-B de *S. mutans*, que se liga à superfície da célula de levedura e então promove a formação de uma matriz rica em glucano *in situ* e pode assim, aumentar o acúmulo de *S. mutans* na superfície do esmalte dos dentes, modulando assim o desenvolvimento de biofilmes virulentos. Além disso, Lai e Li (2011) sugeriram a participação de *C. albicans* na progressão da cárie dental pela capacidade de degradação da estrutura orgânica da dentina. Tais relatos corroboram com o observado para os isolados reunidos no grupo I em relação à coinfeção e manifestação clínica da doença.

O grupo II reuniu os isolados LMICRO09-SM, LMICRO11-SM e LMICRO12-SM, provenientes de crianças coinfectadas por *C. albicans* que possuíam lesão ativa e alto histórico da doença e o isolado LMICRO47-SM procedente de uma criança coinfectada por *C. albicans* e *C. glabrata*, a qual apresentava além do alto histórico, o maior índice da doença (CPO-D=3 e ceo=2). Os genótipos de *S. mutans* pertencentes a este grupo pareciam estar associados à maior expressão de virulência, considerando os índices de cárie destes hospedeiros, uma vez que a maioria dos isolados deste grupo não diferiam quanto à produção de biofilme *in vitro*, com exceção do isolado LMICRO47-SM, o qual apresentava baixa capacidade de aderência *in vitro* (FIGURA 8; TABELA 10). Entretanto, observou-se que este isolado era procedente de uma criança coinfectada por *C. albicans* e *C. glabrata* e com alto índice de cárie, reforçando a evidência de que a associação com diferentes espécies do gênero *Candida* pode potencializar a virulência de *S. mutans*.

No terceiro grupo da árvore (FIGURA 8), a relação entre manifestação clínica da doença e coinfeção foi mais uma vez evidenciada. Neste grupo foram reunidos



os isolados procedentes de crianças coinfetadas (LMICRO24-SM, LMICRO27-SM, LMICRO26-SM, LMICRO29-SM e LMICRO06-SM), além de isolados procedentes de crianças não coinfetadas (LMICRO60-SM, LMICRO33-SM, LMICRO23-SM, LMICRO21-SM, LMICRO03-SM, LMICRO04-SM e LMICRO02-SM), os quais apresentavam média e alta capacidade de formação de biofilme *in vitro*, com valores de absorbância entre 1,58 e 1,06 com exceção dos isolados LMICRO60-SM, LMICRO33-SM com absorbância entre 0,86 e 0,66 respectivamente. Quanto aos dados epidemiológicos os isolados deste grupo estavam associados a hospedeiros que apresentavam variação no histórico da doença.

Tais resultados demonstram que a coinfecção pode ser um dos fatores associados à doença, uma vez que hospedeiros com variação clínica da doença eram colonizados por diferentes isolados de *C. albicans* (id=12 e id=1) ou ainda por *C. albicans* em associação com *C. guilliermondii* (id=7). Além disso, observou-se que os isolados LMICRO24-SM e LMICRO27-SM que apresentavam alta capacidade de aderência, com valores de absorbância entre 1,31 e 1,30 eram procedentes de crianças coinfetadas que não apresentavam manifestação clínica da doença. Entretanto estas crianças eram colonizadas por *C. albicans* genótipo B, frequentemente encontrado nas crianças com baixos índices de CPO-D e ceo-d avaliadas nesse estudo. Tais resultados sugerem mais uma vez que a associação entre *S. mutans* e *C. albicans* do tipo B parece não influenciar na expressão de virulência do *S. mutans* e consequentemente na manifestação clínica da doença.

Entretanto, este não foi o único fator causal da doença relacionado aos isolados do grupo III (FIGURA 8), uma vez que dentro deste grupo foram observados alguns isolados (LMICRO60-SM, LMICRO23-SM e LMICRO21-SM) procedentes de crianças não coinfetadas que apresentavam histórico de cárie e presença de lesão ativa. Porém, de acordo com os dados epidemiológicos (TABELA 10) verificou-se que estas crianças eram, entre as não coinfetadas, as que apresentavam as maiores contagens de *S. mutans* na saliva, evidenciando assim uma relação entre concentração da bactéria na saliva e manifestação clínica da doença. Além disso, foram observados dentro deste grupo os isolados LMICRO03-SM, LMICRO04-SM obtidos de crianças com baixa concentração salivar de *S. mutans* e que apresentavam baixo histórico de cárie, além do isolado LMICRO33-SM procedente de uma criança com ausência de sinais clínicos da doença, e da mesma forma com baixa concentração da bactéria na saliva (TABELA 10).

Vários trabalhos indicam a relação entre concentração de *S. mutans* na saliva e o aumento do risco de desenvolvimento da doença (JENSEN; BRATTHALL, 1989; ALALUUSUA, 1993; BEIGHTON; ADAMSON; RUGG-GUNN, 1996; PETTI; TARSIANI, 1998; GRONROOS, 2000; TAUBMAN; SMITH, 2005). Alaluusua em 1993, já ressaltava a combinação de fatores associados à variabilidade genotípica das linhagens e concentração de *S. mutans* na saliva como alguns dos aspectos multifatoriais desta doença.

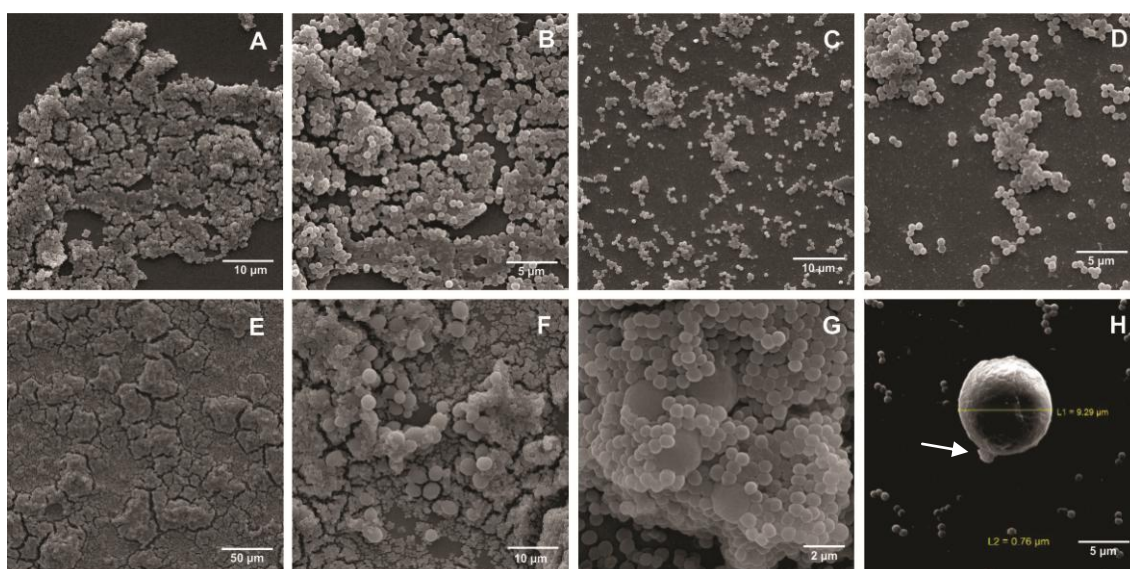
A variabilidade observada com relação aos genótipos de *S. mutans* dos grupos II e III (FIGURA 8) sugere que no grupo II agruparam-se isolados com maior potencial de virulência, já que todos os seus hospedeiros apresentavam histórico da doença, enquanto que no grupo III foi observada variação na expressão clínica da doença dependente dos demais fatores associados à cárie dental que por definição se caracteriza por uma doença de natureza multifatorial, sugerindo que esses fatores podem potencializar a virulência do biofilme.

O IV grupo reuniu os isolados LMICRO19-SM e LMICRO59-SM que expressavam baixa capacidade de formação de biofilme *in vitro*, com valores de 0,78 e 0,68 de absorbância, respectivamente (FIGURA 8; TABELA 10) procedentes de crianças coinfectadas com diferentes históricos da doença. O isolado LMICRO59-SM de *S. mutans* foi obtido de uma criança coinfectada pelas espécies *C. albicans* e *C. tropicalis*, a qual apresentava alto índice da doença (CPO-D=4 e ceo-d=2), enquanto que o isolado LMICRO19-SM colonizava uma criança livre de cárie, porém portadora de *C. albicans* do genótipo B, o qual neste estudo foi frequentemente encontrado em crianças com baixo índice de manifestação clínica da doença. Tais resultados demonstraram mais uma vez que a multicolonização por determinadas espécies e genótipos de *Candida* pode modificar o padrão de virulência de *S. mutans*. Ainda estes resultados sugeriram que a espécie *C. tropicalis* parece ter sido a espécie que mais potencializou a virulência de *S. mutans*.

As análises baseadas no sequenciamento parcial do gene *Gtf-B* demonstraram que a variabilidade genética entre os isolados de *S. mutans* avaliados neste estudo parece estar relacionada à variação no potencial de aderência *in vitro* destes isolados. A variação genética deste fragmento analisado parece estar diretamente ligada ao metabolismo da sacarose e formação de glucanos insolúveis por *S. mutans*. Tais marcadores demonstraram assim serem ferramentas importantes para o estudo do potencial de virulência de *S. mutans*.

A variação na capacidade de aderência *in vitro* dos isolados de *S. mutans* avaliados neste estudo, também foi avaliada por meio de micrografias eletrônicas utilizando biofilmes formados por isolados de *S. mutans* (LMICRO02-SM; LMICRO47-SM) associados e não associados com o isolado (LMICRO523) genótipo A de *C. albicans* (FIGURA 9 A-G).

Nas figuras 9A-B, observou-se o padrão de aderência e formação de biofilme *in vitro* do isolado de *S. mutans* LMICRO02-SM, que apresentava valor médio de absorbância de 1,22. As figuras 9C-D ilustram o biofilme formado pelo isolado LMICRO47-SM, com valor médio de absorbância de 0,75, os quais pertenciam a grupos geneticamente distintos de acordo com a árvore apresentada na figura 8.



**FIGURA 9** - MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DE AMOSTRAS REPRESENTATIVAS DE BIOFILMES *IN VITRO* DE *S. mutans* ISOLADAMENTE E EM ASSOCIAÇÃO COM *C. albicans*.  
FONTE: O AUTOR (2014)

NOTA: **A e B**- BIOFILME FORMADO PELO ISOLADO LMICRO02-SM DE *S. mutans*, EXIBINDO CÉLULAS CONCENTRADAS; **C e D**- BIOFILME FORMADO PELO ISOLADO LMICRO47-SM DE *S. mutans*, EXIBINDO CÉLULAS EM AGRUPAMENTO MAIS ESPARSO EM MENOR CONCENTRAÇÃO; **E e F**- BIOFILME FORMADO PELO ISOLADO LMICRO47-SM DE *S. mutans* ASSOCIADO AO ISOLADO DE *C. albicans* LMICRO523, EXIBINDO CÉLULAS EM AGRUPAMENTO COMPACTO; **G**- BIOFILME FORMADO PELO ISOLADO LMICRO47-SM DE *S. mutans* ASSOCIADO AO ISOLADO DE *C. albicans* LMICRO523 EXIBINDO DETALHES DA COAGREGAÇÃO ENTRE OS DOIS MICRO-ORGANISMOS; **H**- MORFOLOGIA E AS DIMENSÕES DAS CÉLULAS DE *C. albicans* e *S. mutans* EM UM BIOFILME *IN VITRO*, A SETA INDICA *S. mutans* ADERIDO À SUPERFÍCIE DA CÉLULA DA LEVEDURA.

As micrografias eletrônicas de varredura evidenciaram que o isolado de *S. mutans* LMICRO02-SM (FIGURA 9A-B) expressava um biofilme compacto com maior concentração de células, enquanto que o biofilme produzido pelo isolado de

*S. mutans* LMICRO47-SM (FIGURA 9C-D) demonstrava um arranjo mais esperso com menor concentração das células aderidas. Quando o isolado de *S. mutans* LMICRO47-SM (FIGURA 9C-D), com menor capacidade de formação de biofilme foi cultivado em associação com o isolado de *C. albicans* LMICRO523 foi possível observar o aumento da expressão de formação de biofilme (FIGURA 10E-F; 9G-H).

Barbieri *et al.* (2007) investigando essa associação verificou a potencialização de formação de biofilme *in vitro* pelo aumento de concentração de células de *S. mutans* durante o cultivo associado dos dois micro-organismos. Entretanto com o desenvolvimento do presente trabalho foi possível demonstrar que esta associação pode variar em função do genótipo de *C. albicans* e de acordo com a variabilidade intraespecífica de *S. mutans*. Além disso, de acordo com as análises genéticas associadas aos dados epidemiológicos e de formação de biofilme *in vitro* dos isolados de *S. mutans* e para outras espécies do gênero *Candida* estudados nesse trabalho verificou-se que a espécie *C. tropicalis* parece exercer um papel fundamental na expressão da virulência de *S. mutans*.

A formação de biofilmes por leveduras do gênero *Candida* sofre grande interferência da superfície do substrato para sua aderência, sendo que em superfícies lisas, o biofilme formado por leveduras do gênero *Candida* é muito menor do que em superfícies rugosas. A afinidade destas leveduras do gênero por diferentes superfícies têm sido demonstrada em infecções desencadeadas por colonização em cateteres, sondas e diversos tipos de próteses em acrílico (RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006).

A relação simbiótica entre *S. mutans* e *C. albicans* influenciando a capacidade de formação de biofilme *in vitro* foi anteriormente sugerida por Barbieri *et al.* (2007). Gregoire *et al.* (2011), destacaram o papel das enzimas GTF-B, GTF-C e GTF-D na síntese de glucanos insolúveis e solúveis em água, durante a formação de biofilme *in situ* por *S. mutans* e *C. albicans*. De acordo com os autores, os glucanos envolviam as células da levedura favorecendo o acúmulo de *S. mutans*. Desta forma, a concentração de EPSs, pode potencializar o desenvolvimento de biofilmes com potencial de virulência, os quais apresentam novos sítios de adsorção que possibilitam a agregação de outros micro-organismos.

Entre os isolados analisados no presente estudo, observou-se uma diversidade, que pode ser correlacionada ao histórico da doença cárie e padrão de aderência *in vitro*, sendo que os isolados geneticamente diferentes variavam quanto

ao padrão fenotípico da aderência, a qual poderia ser modificada em função da associação com as leveduras do gênero *Candida*.

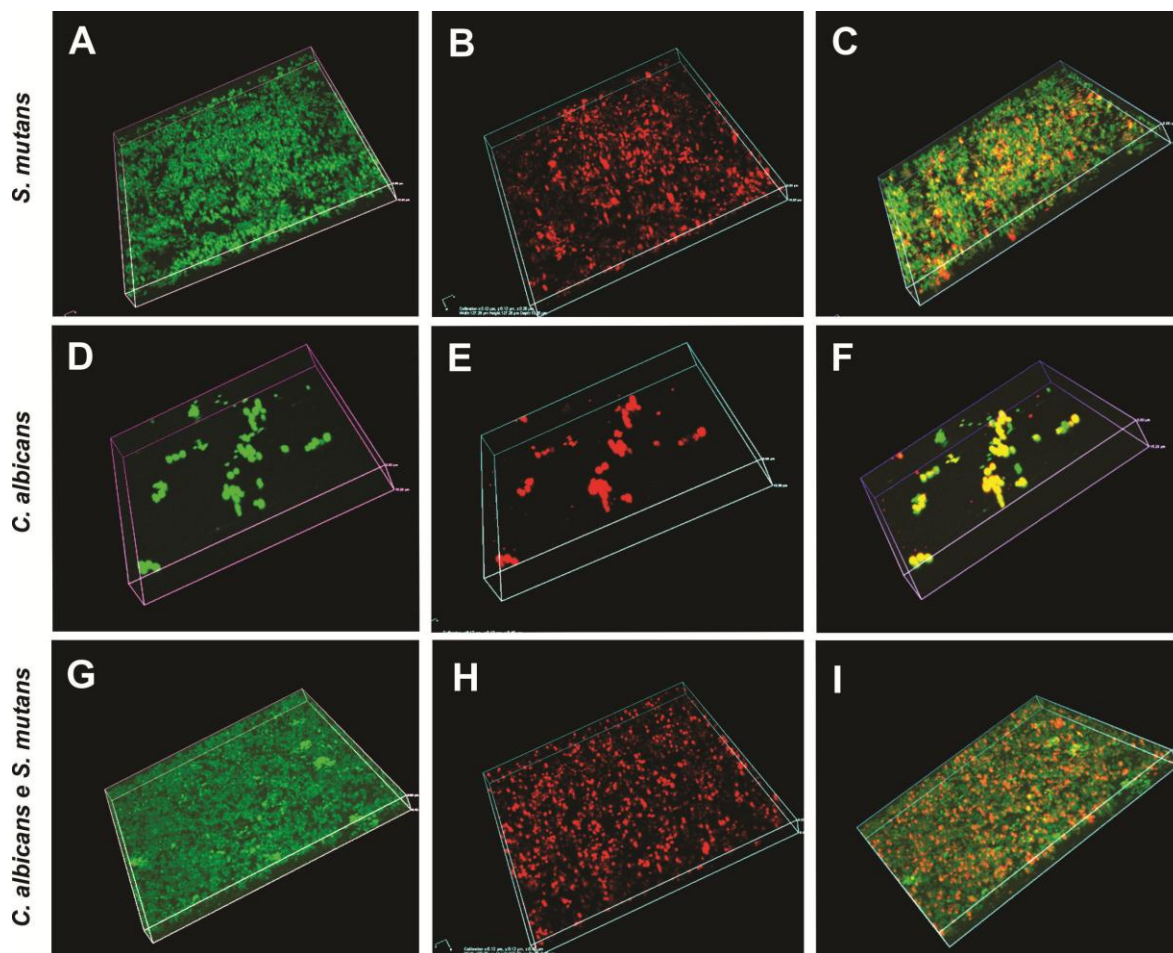
A partir das associações testadas entre os isolados de *S. mutans* e as diferentes espécies e sorotipos de *Candida*, verificou-se que estes micro-organismos apresentam expressões dos mecanismos de aderência influenciável pela multicolonização do biofilme por estas leveduras. Essas evidências indicam que as características genotípicas de cada isolado precisam ser investigadas quanto ao padrão de modulação e expressão gênica, para o esclarecimento dos contrastes observados.

A análise comparativa dos biofilmes produzidos por *S. mutans* e *C. albicans* individualmente e associados, realizadas por microscopia de fluorescência confocal (FIGURAS 10, 11 e 12), permitiram a visualização da organização espacial dos biofilmes quanto à sua estrutura e expressão da matriz extracelular de exopolissacarídeos (EPS).

A partir da visualização do biofilme *in vitro* formado pelos diferentes isolados de *S. mutans* avaliados, observou-se que as células apresentaram-se uniformemente agrupadas verificando-se microcolônias distribuídas em toda a extensão do campo analisado (FIGURA 10A).

A matriz extracelular de polissacarídeos (EPS) do biofilme, formada pelo metabolismo da sacarose, foi observada uniformemente distribuída (FIGURA 10B). A partir da sobreposição das imagens das células e da matriz de EPS do biofilme de *S. mutans*, observou-se a organização estrutural do biofilme como um todo, sendo visualizada a matriz EPS intercalada às células, ao longo de toda a extensão do campo analisado (FIGURA 10C).

Esta evidência indica a interação entre a arquitetura da matriz EPS e as células dos micro-organismos no biofilme conforme observado por Koo *et al.* (2010), onde os autores também destacaram que as enzimas GTF-B e GTF-C são essenciais para formação da matriz EPS, porém a enzima GTF-B foi associada à formação de microcolônias por *S. mutans* no biofilme.



**FIGURA 10** - IMAGENS DE AMOSTRAS REPRESENTATIVAS DOS BIOFILMES PRODUZIDOS PELOS ISOLADOS LMICRO02-SM DE *S. mutans* e LMICRO530 DE *C. albicans*  
 FONTE: O AUTOR (2014)

NOTA: IMAGENS GERADAS NO MICROSCÓPIO CONFOCAL NIKON A1 (NIKON, TOKYO, JAPAN), COM LENTES OBJETIVAS 100X, IMERSAS EM ÓLEO. **A**- CÉLULAS DE *S. mutans* NO BIOFILME (MARCADAS COM SYTOX; EXCITAÇÃO/EMIÇÃO 504/523nm) APRESENTANDO DISTRIBUIÇÃO UNIFORME COM FORMAÇÃO DE MICROCOLÔNIAS; **B**- EPS SINTETIZADOS POR *S. mutans* (MARCADO COM ALEXA FLUOR 647; EXCITAÇÃO/EMIÇÃO 647/668nm); **C**- VISUALIZAÇÃO SIMULTÂNEA DA MATRIZ EPS (VERMELHO) E CÉLULAS DA BACTÉRIA (VERDE) DO BIOFILME DE *S. mutans*; **D**- CÉLULAS DE *C. albicans* ESPARSAMENTE DISTRIBUIDAS NO BIOFILME MARCADAS COM SYTOX; **E**- POLISSACARÍDEOS SINTETIZADOS POR *C. albicans* NA MATRIZ EXTRACELULAR DO BIOFILME; **F**- VISUALIZAÇÃO SIMULTÂNEA DA MATRIZ EPS (VERMELHO) E CÉLULAS DA LEVEDURA (VERDE) DO BIOFILME DE *C. albicans*; **G**- CÉLULAS DE *S. mutans* E *C. albicans* NO BIOFILME MARCADAS COM SYTOX; **H**- EPS SINTETIZADOS POR *S. mutans* DISTRIBUÍDOS DE FORMA HOMOGÊNEA NA MATRIZ EXTRACELULAR DO BIOFILME; **I**- VISUALIZAÇÃO SIMULTÂNEA DA MATRIZ EPS (VERMELHO) E CÉLULAS DOS DOIS MICRO-ORGANISMOS (VERDE).

Quanto ao biofilme *in vitro* formado por *C. albicans*, foi observada uma menor concentração de células, comparada ao arranjo das células no biofilme de *S. mutans* demonstrando que a aderência da levedura foi bem menor (FIGURA 10D). A formação de matriz de EPS, evidenciada por fluorescência vermelha foi correspondente à distribuição das células do micro-organismo (FIGURA 10E).

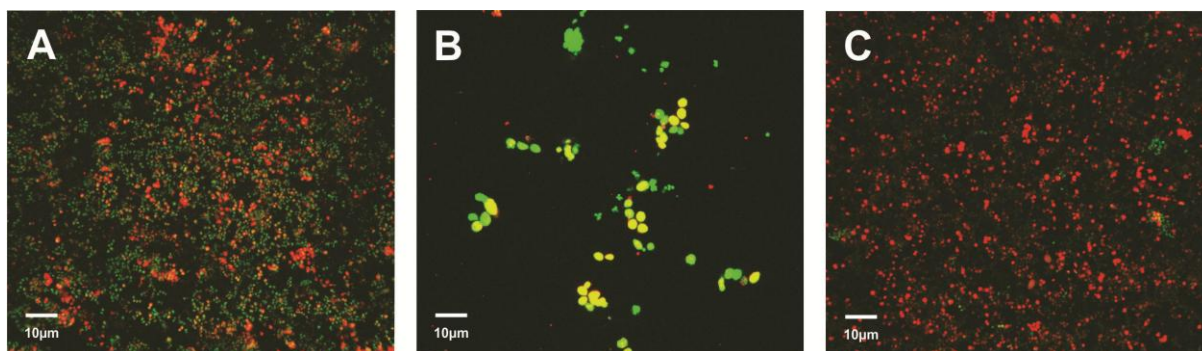
Entretanto, verificou-se que após a sobreposição das imagens, em algumas células a fluorescência evidenciada apresentou-se de coloração amarela (FIGURA 10F), sugerindo a presença de polissacarídeos intracelulares. Essa observação também foi relatada por Lal *et al.* (2010) onde os autores analisaram a produção de exopolissacarídeos em biofilmes produzidos por um isolado clínico de *C. albicans*.

No biofilme formado por *S. mutans* e *C. albicans* (células evidenciadas em fluorescência verde), foi observado um aumento da concentração de células de *S. mutans* (por meio do aumento de células de tamanho correspondente ao padrão de *S. mutans*) em relação à concentração de *C. albicans* (FIGURA 10G). Além disso, ao observar a expressão de EPS, verificou-se um aumento da intensidade da fluorescência vermelha (FIGURA 10H), mostrando a maior produção de EPS para os organismos em associação (FIGURA 10I). Esta evidência confirma que a presença de *C. albicans* favorece o aumento da concentração de células *S. mutans* e consequentemente a maior expressão de EPS na matriz do biofilme. Esta constatação corrobora o trabalho de Gregoire *et al.* (2011) onde os autores estudaram o papel da GTF-B na interação de *C. albicans* com *S. mutans* em biofilme *in situ* produzido em discos de hidroxiapatita e demonstraram a cooperativa relação entre esses organismos na produção de biofilme.

A figura 11 apresenta imagens representativas comparativas em máxima projeção dos biofilmes formados pelo isolado LMICRO59-SM de *S. mutans* e LMICRO512 de *C. albicans* mostrando no biofilme de *S. mutans* a distribuição homogênea de células e matriz extracelular (FIGURA 11A), enquanto que o biofilme produzido por *C. albicans* revelava a presença de fluorescência amarela, observado na (FIGURA 11B), indicando a presença de polissacarídeos capsulares e ausência de matriz extracelular. No biofilme formado pelos micro-organismos em associação (FIGURA 11C) foi possível observar o aumento de EPS.

A figura 12A-B ilustra a diferença na expressão de EPS dos biofilmes de *S. mutans* LMICRO02-SM isoladamente (FIGURA 12A) e associado ao isolado de *C. albicans* LMICRO523 (FIGURA 12B). A maior intensidade de fluorescência vermelha confirmou a maior expressão de EPS no biofilme decorrente da associação.

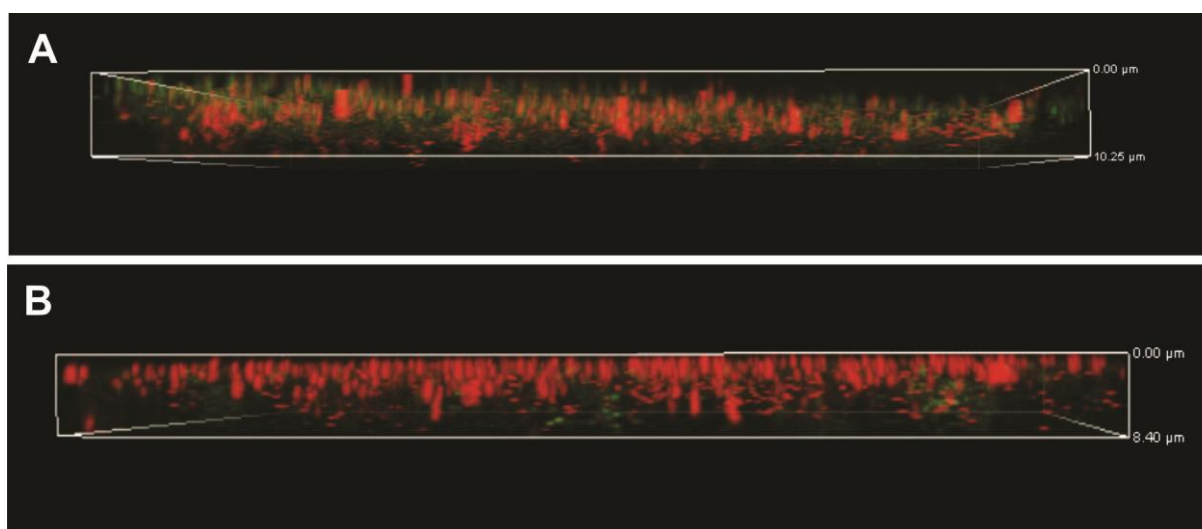




**FIGURA 11** - IMAGENS REPRESENTATIVAS, EM MÁXIMA PROJEÇÃO, DOS BIOFILMES PRODUZIDOS PELOS ISOLADOS LMICRO59-SM DE *S. mutans* E LMICRO512 DE *C. albicans* ISOLADAMENTE E ASSOCIADOS.

FONTE: O AUTOR (2014)

NOTA: IMAGENS GERADAS PELO MICROSCÓPIO CONFOCAL NIKON A1 (NIKON, TOKYO, JAPAN) COM LENTES OBJETIVAS 100X, IMERSAS EM ÓLEO. **(A)** BIOFILME DE *S. mutans* MOSTRANDO ARRANJO UNIFORME DAS CÉLULAS AGRUPADAS COMPACTAMENTE (VERDE) COM PRODUÇÃO HOMOGÊNEA DE EPS (VERMELHO). **(B)** BIOFILME DE *C. albicans* COM CÉLULAS DISTRIBUÍDAS DE FORMA MAIS ESPARSA COMPARADA ÀS DA BACTÉRIA (VERDE), COM BAIXA PRODUÇÃO DE EPS (VERMELHO) **(C)** BIOFILME FORMADO PELOS MICRO-ORGANISMOS EM ASSOCIAÇÃO MOSTRANDO A MAIOR CONCENTRAÇÃO DE EPS.



**FIGURA 12** - IMAGENS REPRESENTATIVAS COMPARATIVAS DA ESPESSURA DE PRODUÇÃO DE EPS DE BIOFILMES DE *S. mutans* ISOLADAMENTE E ASSOCIADO À *C. albicans*

FONTE: O AUTOR (2014)

NOTA: IMAGENS PRODUZIDAS NO MICROSCÓPIO CONFOCAL NIKON A1 (NIKON, TOKYO, JAPAN) COM LENTES OBJETIVAS 100X, IMERSAS EM ÓLEO. **A-** AMOSTRA DE BIOFILME DO ISOLADO LMICRO02-SM DE *S. mutans*; **B-** AMOSTRA DE BIOFILME DO ISOLADO LMICRO02-SM DE *S. mutans* ASSOCIADO AO ISOLADO LMICRO523 DE *C. albicans* MOSTRANDO A MAIOR INTENSIDADE DA FLUORESCÊNCIA VERMELHA INDICANDO MAIOR PRODUÇÃO DE EPS NO BIOFILME DOS MICRO-ORGANISMOS EM ASSOCIAÇÃO.



Neste estudo foi demonstrado o papel das interações entre micro-organismos que compõem a microbiota bucal no desenvolvimento da cárie dental, por meio da relação entre a formação do biofilme *in vitro* por *S. mutans* na presença e ou ausência de leveduras do gênero *Candida*, variabilidade genética de diferentes isolados e os dados epidemiológicos da doença. Os resultados evidenciaram que as leveduras do gênero *Candida* associadas à bactéria *S. mutans* parecem exercer influência no perfil de virulência do biofilme.

## 6 CONCLUSÕES

Este trabalho revelou a grande complexidade na correlação entre os genótipos dos micro-organismos estudados, capacidade de formação de biofilme e associação com a manifestação clínica da doença cárie. Com base na metodologia utilizada e nos resultados obtidos concluiu-se que:

- Houve variação quanto à capacidade de formação de biofilme *in vitro* entre os isolados analisados, com identificação de variabilidade genética inter e intraespecífica para as leveduras do gênero *Candida* e interespecífica entre os isolados de *S. mutans*.
- Os dados epidemiológicos e as relações filogenéticas entre os isolados estudados sugeriram que genótipos e a presença de coinfeção por *S. mutans* e leveduras do gênero *Candida* podem exercer influência no perfil de virulência do biofilme.
- Hospedeiros colonizados por *C. albicans* genótipo A, assim como portadores de leveduras não-albicans, principalmente *C. tropicalis* exibiram os maiores índices de cárie sugerindo o aumento da virulência do biofilme em portadores dessas espécies.
- A partir das associações entre os isolados de *S. mutans* e as diferentes espécies e genótipos de *Candida* verificou-se que esses micro-organismos apresentam variações no perfil de aderência *in vitro* em função das interações testadas.

## REFERÊNCIAS

- ABRANCHES, J.; CANDELLA, M. M.; WEN, Z. T.; BAKER, H. V.; BURNE, R. A. Different roles of EIIABMan and EIIIGlc in regulation of energy metabolism, biofilm development, and competence in *Streptococcus mutans*. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 11, p. 3748-3756, 2006.
- ABRANCHES, J.; LEMOS, J. A. Stress Responses in *Streptococcus*. In: Jose M. Requena Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM). **Stress Response in Microbiology**. Madri: Caister Academic Press, 2012. p.19-39.
- AHN S. J.; LEMOS J. A.; BURNE, R. A. Role of HtrA in growth and competence of *Streptococcus mutans* UA159. **J Bacteriol**, v. 187, p. 3028–3038, 2005.
- AJDIĆ, D.; MCSHAN, W. M.; MCLAUGHLIN, R. E.; SAVIĆ, G.; CHANG, J.; CARSON, M. B.; FERRETTI, J. J. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 22, p. 14434-14439, 2002.
- AKDENIZ B. G.; KOPARAL E.; SEN B. H.; ATES, M.; DENIZCI, A. A. Prevalence of *Candida albicans* in oral cavities and root canals of children, **Journal of Dentistry for Children**, v. 69, n. 3, p. 289-292, 2002.
- ALALUUSUA, S. Salivary counts of mutans streptococci and lactobacilli and past caries experience in caries prediction. **Caries research**, v. 27, n. 1, p. 68-71, 1993.
- ANTUNES L. C. M. A Linguagem das Bactérias. **Ciência Hoje**, v. 33, p. 193, 2003.
- ARENDORF, T. M.; WALKER, D. M. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. **Archives of Oral Biology**, v. 25, n. 1, p. 1-10, 1980.
- ARGIMÓN, S.; CAUFIELD, P. W. Distribution of putative virulence genes in *Streptococcus mutans* strains does not correlate with caries experience. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 3, p. 984-992, 2011.
- BAGG, J.; SILVERWOOD, R. W. Coagglutination reactions between *Candida albicans* and oral bacteria. **Journal of medical microbiology**, v. 22, n. 2, p. 165-169, 1986.
- BANAS, J. A. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. **Frontiers in Biosciences**, v. 9, p. 1267–1277, 2004.
- BARBIERI, D. S. V.; VICENTE, V. A.; FRAIZ, F. C.; LAVORANTI, O.J.; SVIDZINSKI, T.I.E.; PINHEIRO, R. L. Analysis of the *In Vitro* Adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 624-631, 2007.
- BEIGHTON, D., RIPPON, H. R., THOMAS, H. E. The distribution of *Streptococcus mutans* serotypes and dental caries in a group of 5-to 8-year-old Hampshire schoolchildren. **British dental journal**, v. 162, n. 3, p. 103-106, 1987.

BEIGHTON, D., ADAMSON, A., RUGG-GUNN A. Associations between dietary intake, dental caries experience and salivary bacterial levels in 12-year-old English schoolchildren. **Archives of Oral Biology**, v.41, n. 3, p. 271-280, 1996

BISWAS, S.; BISWAS, I. Role of HtrA in surface protein expression and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. **Infection and immunity**, v. 73, n. 10, p. 6923-6934, 2005.

BOWEN, WH; AMSBAUGH, SM; MONELL-TORRENS, S; BRUNELLE, J; KUZMIAK-JONES, H; COLE, MF. A method to assess cariogenic potential of foodstuffs. **Journal of American Dental Association**, v. 100, p. 677 – 681, 1980.

BOWEN, W. H. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? **Journal of American Dental Association**., v.133, p. 1405–1407, 2002.

BOWEN, W. H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries research**, v.45, n. 1, p. 69-86, 2011.

BRANTING, C.; SUND, M. L.; LINDER, L. E. The influence of *Streptococcus mutans* on adhesion of *Candida albicans* to acrylic surfaces *in vitro*. **Archives of Oral Biology**, v. 34, n.5, p. 347-353, 1989.

BROGDEN, K. A. Polymicrobial Diseases of Animals and Humans. In: BROGDEN, K. M.; GUTHMILLER, J. M. (editors). **Polymicrobial diseases**. Washington: ASM Press, 2008. p. 1-29.

CANNON, R. D.; CHAFFIN, W. L. Oral colonization by *Candida albicans*. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v.10, n.3, p. 359-383, 1999.

CANNON, R. D.; HOLMES, A. R.; MASON, A. B.; MONK, B. C. Oral *Candida*: clearance, colonization or Candidiasis. **Journal of Dental Research**, v. 74, p. 1152-1161, 1995.

CANNON, R. D.; NAND, A. K.; JENKINSON, H. F. Adherence of *Candida albicans* to human salivary components adsorbed to hydroxylapatite. **Microbiology**, v. 141, n. 1, p. 213-219, 1995.

CARRETO, C. F. P.; NAVAS, E. A. F. A.; PARADELLA, T. C.; OLIVEIRA, L. D.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. Efeitos do chá de tomilho sobre a aderência *in vitro* de *Streptococcus mutans* ao esmalte dentário e *Candida albicans* à resina acrílica. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 36, n. 3, p. 281-286, 2007.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; QUINDÓS, G.; CÁRDENES, C. D.; VARGAS, R. A.; ARÉVALO, P.; BRIÓ, S.; MADARIAGA, L. Evaluación del medio Chromalbicans Agar para la identificación presuntiva de *Candida albicans*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.18, p. 501-108, 2001.

CAUFIELD, P. W.; CUTTER, G. R.; DASANAYAKE, A. P. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. **Journal of Dental Research**, v. 72, n. 1, p. 37-45, 1993.

CHAFFIN, W. L.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; CASANOVA, M.; GOZALBO, D.; MARTÍNEZ, J. P. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 1, p. 130-180, 1998.

CHANDRA, J.; KUHN, D. M.; MUKHERJEE, P. K.; HOYER, L. L.; MCCORMICK, T.; GHANNOUM, M. A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5385-5394, 2001.

CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. *In vitro* growth and analysis of *Candida* biofilms. **Nature protocols**, v. 3, n. 12, p. 1909-1924, 2008.

CHEN, Z.; SAXENA, D.; CAUFIELD, P. W.; GE, Y.; WANG, M.; LI, Y. Development of species-specific primers for detection of *Streptococcus mutans* in mixed bacterial samples. **FEMS microbiology letters**, v. 272, n. 2, p. 154-162, 2007.

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; YOUNGER, J. J.; BADDOUR, L. M.; BARRETT, F. F.; MELTON, D. M.; BEACHEY, E. H. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, p. 996–1006, 1985.

CLARKE, J. K. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. **British journal of experimental pathology**, v.5, n. 3, p. 141, 1924.

CLAUSEN, T.; SOUTHAN, C.; EHRMANN, M. The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. **Molecular Cell**, v.10, p. 443–455, 2002.

COENYE, T.; NELIS, H. J. *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, v. 83, n. 2, p. 89-105, 2010.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

COLOMBO, A.L. et.al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis: a joint meeting report of three medical societies – Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia, Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v.16, (Supl.1) p.S1-S34, 2012.

COOKE, V. M.; MILES, R. J.; PRICE, R. G.; MIDGLEY, G.; KHAMRI, W.; RICHARDSON, A. C. New chromogenic agar medium for the identification of *Candida* spp. **Applied and Environmental microbiology**, v. 68, n. 7, p. 3622-3627, 2002.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

CROUS, P.W.; VERKLEY, G.J.M.; GROENEWALD, J.Z.; SAMSON, R.A (eds). **Fungal Biodiversity**. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2009. 269p (CBS Laboratory Manual Series 1).

DARWAZEH, A. M. G.; AL-BASHIR, A. Oral candidal flora in healthy infants. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 24, n. 8, p. 361-364, 1995.

DO CARMO OLIVEIRA, N.; RAMPAZZO, R. D. C. P.; MINARI, M. C.; CORRÊA, P. R. C.; CARNEIRO, M.; SVIDZINSKI, T. I. E.; YAMADA-OGATTA, S. F. Utilização de um meio cromogênico e da técnica de semi-nested PCR para identificação de espécies de *Candida*. Semina. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 27, n. 2, p. 125-132, 2006.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DUGAN, K.A; LAWRENCE, H.S.; HARES, D.R. ; FISHER, C.L. ; BUDOWLE, B. An improved method for post-PCR purification for mtDNA sequence analysis. **Journal of Forensic Sciences**, v. 47, p. 811–818, 2002.

FIDEL, P. L.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 80-96, 1999.

FILLER, S. G. *Candida* host cell receptor–ligand interactions. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 4, p. 333-339, 2006.

FITZGERALD, D. B.; FITZGERALD, R. J.; ADAMS, B. O. ; MORHART, R. E. Prevalence, distribution of serotypes, and cariogenic potential in hamsters of mutans streptococci from elderly individuals. **Infection and Immunity**, v. 41, p.691-697, 1983.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.

FOTOS, P. G.; VINCENT, S. D.; HELLSTEIN, J. W. Oral candidosis: clinical, historical, and therapeutic features of 100 cases. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology**, v. 74, n. 1, p. 41-49, 1992.

FUKUSHIMA, K.; IKEDA, T.; KURAMITSU, H. K. Expression of *Streptococcus mutans* *gtf* genes in *Streptococcus milleri*. **Infection and immunity**, v. 60, n. 7, p. 2815-2822, 1992.

GARCÍA-SÁNCHEZ, S.; AUBERT, S.; IRAQUI, I.; JANBON, G.; GHIGO, J. M.; D'ENFERT, C. *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with

specific and stable gene expression patterns. **Eukaryotic cell**, v. 3, n. 2, p. 536-545, 2004.

GAUR, N. K.; KLOTZ, S. A. Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, ALA1, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. **Infection and immunity**, v. 65, n. 12, p. 5289-5294, 1997.

GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; DE HOOG, G.S. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. **Studies in Mycology**, v. 43, p. 151-162, 1999.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 122-143, 2000.

GOLD, O. G.; JORDAN, H. V.; VAN HOUTE, J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. **Archives of Oral Biology**, v. 18, n. 11, p. 1357-1364, 1973.

GOUVÊA-MONDIN, M. E.; HÖFLING, J. F. Colonization of the oral cavity of children by *Candida* spp.–role in the etiology of the dental decay. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 23, n. 4, p. 315-325, 2005.

GREEN, C. B.; CHENG, G.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.; GHANNOUM, M. A.; HOYER, L. L. RT-PCR detection of *Candida albicans* ALS gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. **Microbiology**, v. 150, n. 2, p. 267-275, 2004.

GREGOIRE, S.; XIAO, J.; SILVA, B. B.; GONZALEZ, I.; AGIDI, P. S.; KLEIN, M. I.; KOO, H. Role of glucosyltransferase B in interactions of *Candida albicans* with *Streptococcus mutans* and with an experimental pellicle on hydroxyapatite surfaces. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n.18, p. 6357-6367, 2011.

GRÖNROOS, L. **Quantitative and qualitative Characterization of *mutans streptococci* in saliva and in the dentition**, 80f. Dissertação acadêmica. Department of Pedodontics and orthodontics, Institute of Dentistry, University of Helsinki and department of Oral and Maxillofacial Diseases, Helsinki University Central Hospital, Helsinki, 2000.

GRÖNROOS, L.; ALALUUSUA, S. Site-specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. **Caries research**, v. 34, n. 6, p. 474-480, 2000.

HAMADA, S.; SLADE, H. D. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiological reviews**, v. 44, n. 2, p. 331, 1980.

HARRIOTT, M. M.; LILLY, E. A.; RODRIGUEZ, T. E.; FIDEL, P. L., JR.; NOVERR, M. C. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. **Microbiology**, v.156, p. 3635–3644, 2010.

HAUSEN, H. Predição de Cárie Dentária. In: FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie dentária. A doença e seu tratamento clínico**. São Paulo: Ed. Santos, 2005. p. 325-341.

HAWSER, S. P.; BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms. **Journal of medical microbiology**, v. 47, n. 3, p. 253-256, 1998.

HEYDORN, A.; NIELSEN, A. T.; HENTZER, M.; STERNBERG, C.; GIVSKOV, M.; ERSBOLL, B. K.; MOLIN, S. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. **Microbiology**, v. 146, n. 10, p. 2395-2407, 2000.

HÖFLING, F. J.; MONTEIRO, B. L.; ALVES C. B. A. A.; DE LAET S. M. P.; GONÇALVES B. R. Colonização bucal por espécies de *Candida*-Parte I-Prevalência e colonização. **Revista da Faculdade de Odontologia-UPF**, v. 9, n. 1, 2011.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; & WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore (MD): William & Wilkins, 1994. 787p.

HOYER, L. L.; PAYNE, T. L.; BELL, M.; MYERS, A. M.; SCHERER, S. *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. **Current genetics**, v. 33, n. 6, p. 451-459, 1998.

HOYER, L. L. The ALS gene family of *Candida albicans*. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 4, p. 176-180, 2001.

HOYER, L. L.; HECHT, J. E. The ALS5 gene of *Candida albicans* and analysis of the Als5p N-terminal domain. **Yeast**, v. 18, p. 49-60, 2001.

HOYER, L. L.; SCHERER, S.; SHATZMAN, A. R.; LIVI, G. P. *Candida albicans* ALS1: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif. **Molecular Microbiology**, v. 15, p. 39-54, 1995.

HUBE, B.; STEHR, F.; BOSSENZ, M.; MAZUR, A.; KRETSCHMAR, M.; SCHÄFER, W. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. **Archives of microbiology**, v. 174, n. 5, p. 362-374, 2000.

HUBE, B.; NAGLIK, J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**, v. 147, n. 8, p. 1997-2005, 2001.

HUDSON, M. C.; CURTISS, R. Regulation of expression of *Streptococcus mutans* genes important to virulence. **Infection and immunity**, v. 58, n. 2, p. 464-470, 1990.

JEFFERSON, K. K.; GOLDMANN, D. A.; PIER, G. B. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2467-2473, 2005.



JENKINSON, H. F.; LALA, H. C.; SHEPHERD, M. G. Coaggregation of *Streptococcus sanguis* and other streptococci with *Candida albicans*. **Infection and immunity**, v. 58, n. 5, p. 1429-1436, 1990.

JENSEN, B.; BRATTHALL, D. A new method for the estimation of mutans streptococci in human saliva. **Journal of Dental Research**, v. 68 n.3, p. 468-471. 1989

KADIR, T.; UYGUN, B.; AKYÜZ, S. Prevalence of *Candida* species in Turkish children: relationship between dietary intake and carriage. **Archives of oral biology**, v. 50, n. 1, p. 33-37, 2005.

KAM, A. P.; XU, J. Diversity of commensal yeasts within and among healthy hosts. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 43, n. 1, p. 19-28, 2002.

KAMIYA, R. U.; TAIETE, T.; GONÇALVES, R. B. Mutacins of *Streptococcus mutans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1248-1258, 2011.

KATOH, K.; TOH, H. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. **Briefings in bioinformatics**, v. 9, n. 4, p. 286-298, 2008.

KLEIN H.; PALMER C. E. Dental caries in American Indian children. **Public Health Bull**, v. 239, p. 1-53, 1937.

KLEIN, M. I.; DUARTE, S.; XIAO, J.; MITRA, S.; FOSTER, T. H.; KOO, H. Structural and molecular basis of the role of starch and sucrose in *Streptococcus mutans* biofilm development. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 3, p. 837-841, 2009.

KLEINBERG, I. A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to *Streptococcus mutans* and the specific-plaque hypothesis. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 13, n. 2, p. 108-125, 2002.

KLEINEGGER, C. L.; LOCKHART, S. R.; VARGAS, K.; SOLL, D. R. Frequency, intensity, species, and strains of oral *Candida* vary as a function of host age. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2246-2254, 1996.

KOHLER, B.; KRASSE, B. Human strains of mutans streptococci show different cariogenic potential in the hamster model. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 5, p.177-180, 1990.

KÖHLER, B.; BIRKHED, D.; OLSSON, S. Acid production by human strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, **Caries Research**, v.29, n.5, p.402-406, 1995.

KOMIYAMA, E. Y.; RIBEIRO, P. M.; JUNQUEIRA, J. C.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. C. Prevalence of yeasts in the oral cavity of children treated with inhaled corticosteroids. **Brazilian oral research**, v. 18, n. 3, p. 197-201, 2004.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W.C. **Diagnostic Microbiology**, 5ª ed., Rio de Janeiro: MEDSI-Editora Médica e Científica Ltda., 2001. 1465p.

KOO, H., PEARSON, S. K., SCOTT-ANNE, K., ABRANCHES, J., CURY, J. A., ROSALEN, P. L.; BOWEN, W. H. Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. **Oral microbiology and immunology**, v.17, n. 6, p. 337-343, 2002.

KOO, H.; XIAO, J.; KLEIN, M. I.; JEON, J. G. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 12, p. 3024-3032, 2010.

KOTHAVADE, R. J.; KURA, M. M.; VALAND, A. G.; PANTHAKI, M. H. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Journal of medical microbiology**, v. 59, n. 8, p. 873-880, 2010.

KRASSE, B. **Risco de cárie**: um guia prático para avaliação e controle. Tradução: José Luiz Freire de Andrade. São Paulo: Quintessence, 1988. 113p.

KROM, B.P., COHEN, J.B., FESER, G.E.M., CIHLAR, R.L. Optimized candidal biofilm microtiter assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 68, p. 421-423, 2007.

KURAMITSU, H. K. Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 4, p. 159–176, 1993.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification of Clinically Important Ascomycetous Yeasts Based on Nucleotide Divergence in the 59 End of the Large-Subunit (26S) Ribosomal DNA Gene. **Journal Of Clinical Microbiology** v. 35, p. 1216–1223, 1997.

LAFLEUR, M. D. **Characterization and eradication of persisters in *Candida albicans* biofilms**. 90f. Dissertation of Doctor of Philosophy. Northeastern University. Department of Biology. 2008.

LAI, G.; LI, M. The possible role of *Candida albicans* in the progression of dental caries. **International Research Journal of Microbiology**, v. 2, p. 504-506, 2011.

LAL, P.; SHARMA, D.; PRUTHI, P.; PRUTHI, V. Exopolysaccharide analysis of biofilm-forming *Candida albicans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 1, p. 128-136, 2010.

LEBEAUX, D.; CHAUHAN, A.; RENDUELES, O.; BELOIN, C. From *in vitro* to *in vivo* Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. **Pathogens**, v. 2, n. 2, p. 288-356, 2013.

LEME, A. P.; KOO, H.; BELLATO, C. M.; BEDI, G.; CURY, J. A. The Role Of Sucrose In Cariogenic Dental Biofilm Formation—New Insight. **Journal Of Dental Research**, v. 85, n. 10, p. 878-887, 2006.

LEMOS J. A.; ABRANCHES J. BURNE R. A. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses, **Current Issues in Molecular Biology**, v. 7, n. 1, p. 95-107, 2005.

LEMOS J. A.; ABRANCHES J.; KOO H.; MARQUIS R. E.; BURNE R. A. Protocols to study the physiology of oral biofilms, **Methods in Molecular Biology**, v.666, p. 87-102, 2010.

LEN, A. C.; HARTY, D. W.; JACQUES, N. A. Stress-responsive proteins are upregulated in *Streptococcus mutans* during acid tolerance. **Microbiology**, v. 150, n. 5, p. 1339-1351, 2004a.

LEN, A. C.; HARTY, D. W.; JACQUES, N. A. Proteome analysis of *Streptococcus mutans* metabolic phenotype during acid tolerance. **Microbiology**, v. 150, n. 5, p.1353-1366, 2004b.

LI, Y. H., TANG, N., ASPIRAS, M. B., LAU, P. C., LEE, J. H., ELLEN, R. P., CVITKOVITCH, D. G. A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. **Journal of bacteriology**, v. 184, n.10, p. 2699-2708, 2002.

LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiological reviews**, v. 50, n. 4, p. 353, 1986.

LOZA, L.; FU, Y.; IBRAHIM, A. S.; SHEPPARD, D. C.; FILLER, S. G.; EDWARDS, J. E. Functional analysis of the *Candida albicans* ALS1 gene product. **Yeast**, v. 21, n. 6, p. 473-482, 2004.

MANFREDI, M.; MCCULLOUGH, M. J.; POLONELLI, L.; CONTI, S.; AL-KARAAWI, Z. M.; VESCOVI, P.; PORTER, S. R. *In vitro* antifungal susceptibility to six antifungal agents of 229 *Candida* isolates from patients with diabetes mellitus. **Oral microbiology and immunology**, v. 21, n. 3, p. 177-182, 2006.

MARSH, P.; MARTIN, M. V.; WILLIAMS, D. W. **Oral microbiology**. 3rd ed., London: Chapman & Hall, 1992. p. 16-17.

MARTINS, M.; HENRIQUES, M.; RIBEIRO A. P.; FERNANDES, R.; GONÇALVES, V.; SEABRA, A.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. Oral *Candida* carriage of patients attending a dental clinic in Braga, Portugal. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 27, p. 119-124, 2010.

MASUOKA, J. Surface glycans of *Candida albicans* and other pathogenic fungi: physiological roles, clinical uses, and experimental challenges. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 2, p. 281-310, 2004.

MATA DE HENNING, M.; PERRONE, M. The dental prosthesis in the ecology of *Candida albicans* in the oral cavity. **Acta odontológica venezolana**, v. 39 n. 3, p. 18-24, 2001.

MATEE, M. I. N.; MIKX, F. H. M.; SOET, J. S.; MASELLE, S. Y.; GRAAFF, J.; PALENSTEIN HELDERMAN, W. H. Mutans streptococci in caries-active and caries-free infants in Tanzania. **Oral microbiology and immunology**, v. 8, n. 5, p. 322-324, 1993.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, p. 119-128, 2013.

MCCULLOUGH, M. J. K.; CLEMONS, V.; STEVENS, D. A. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 417-421, 1999.

MCCULLOUGH, M. J.; ROSS, B. C.; READE, P. C. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 25, n. 2, p. 136-144, 1996.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 165-199, 2001.

MONOD, M.; CAPOCCIA, S.; LÉCHENNE, B.; ZAUGG, C.; HOLDOM, M.; JOUSSON, O. Secreted proteases from pathogenic fungi. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, n. 5, p. 405-419, 2002.

MOREIRA, D.; SPOLIDÓRIO, D. M. P.; RODRIGUES, J. A. D. O.; BORIOLO, M. F. G.; PEREIRA, C. V.; ROSA, E. A. R.; HÖFLING, J. F. *Candida* spp. biotypes in the oral cavity of school children from different socioeconomic categories in Piracicaba-SP, Brazil. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 15, n. 3, p. 187-195, 2001.

MÖRMANN, J. E.; MÜHLEMANN, H. R. Oral starch degradation and its influence on acid production in human dental plaque. **Caries research**, v. 15, n. 2, p. 166-175, 1981.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-64, 1983.

MUKHERJEE, P. K.; ZHOU, G.; MUNYON, R.; GHANNOUM, M. A. *Candida* biofilm: a well-designed protected environment. **Medical mycology**, v. 43, n. 3, p. 191-208, 2005.

NAGLIK, J.; ALBRECHT, A.; BADER, O.; HUBE, B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cellular microbiology**, v. 6, n. 10, p. 915-926, 2004.

NAILIS, H.; KUCHARÍKOVÁ, S.; ŘÍČICOVÁ, M.; VAN DIJCK, P.; DEFORCE, D.; NELIS, H.; & COENYE, T. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and-independent gene expression. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p.114, 2010.

NAKANO, K.; NOMURA, R.; NAKAGAWA, I.; HAMADA, S.; OOSHIMA, T. Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype, k, in the human oral cavity. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 1, p. 198-202, 2004.

NAPIMOGA, M. H.; KAMIYA, R. U.; ROSA, R. T.; ROSA, E. A.; HÖFLING, J. F.; DE OLIVEIRA MATTOS-GRANER, R.; GONÇALVES, R. B. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 697-703, 2004.

NEU, T. R.; LAWRENCE, J. R. Lectin-binding analysis in biofilm systems. **Methods in enzymology**, v. 310, p. 145-152, 1999.

NIKAWA, H.; HAMADA, T.; YAMASHIRO, H.; MURATA, H.; SUBIWAHJUDI, A. The effect of saliva or serum on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* colonization of hydroxylapatite beads. **Journal of dentistry**, v. 26, n. 1, p. 31-37, 1998.

NIKAWA, H.; YAMASHIRO, H.; MAKIHIRA, S.; NISHIMURA, M.; EGUSA, H.; FURUKAWA, M.; SETIJANTO, D. *In vitro* cariogenic potential of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 46, p. 471-478, 2003.

NISENGARD R. J.; NEWMAN M. G. **Microbiologia Oral e Imunologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994, 395p.

NOBILE, C. J.; SCHNEIDER, H. A.; NETT, J. E.; SHEPPARD, D. C.; FILLER, S. G.; ANDES, D. R.; MITCHELL, A. P. Complementary Adhesin Function in *C. albicans* Biofilm Formation. **Current Biology**, v. 18, n. 14, p. 1017-1024, 2008.

O'CONNOR, L.; LAHIFF, S.; CASEY, F.; GLENNON, M.; CORMICAN, M.; MAHER, M. Quantification of ALS1 gene expression in *Candida albicans* biofilms by RT-PCR using hybridisation probes on the LightCycler™. **Molecular and cellular probes**, v. 19, n. 3, p. 153-162, 2005.

ODDS, F. C.; BERNARTS, R. I. A. (. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **Journal of clinical microbiology**, v. 32, n. 8, p. 1923-1929, 1994.

OHO, T.; YAMASHITA, Y.; SHIMAZAKI, Y.; KUSHIYAMA, M.; KOGA, T. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva

by polymerase chain reaction. **Oral microbiology and immunology**, v. 15, n. 4, p. 258-262, 2000.

OLLERT, M. W., WENDE, C., GÖRLICH, M., MCMULLAN-VOGEL, C. G., BORG-VON ZEPELIN, M., VOGEL, C. W., & KORTING, H. C. Increased expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from human immunodeficiency virus-positive patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, n. 10, p. 2543-2549, 1995.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 49-79, 2000.

PAGE, B. T.; KURTZMAN, C. P. Rapid identification of *Candida* species and other clinically important yeast species by flow cytometry. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4507-4514, 2005.

PALLEN, M. J.; WREN, B. W. The HtrA family of serine proteases. **Molecular Microbiology**, v. 26, p. 209-221, 1997.

PETTI S.; TARSITANI G. Intra-individual variations of salivary microbial levels in young adults. **European Journal of Oral Sciences**, v., p. 106:616-622, 1998

QI, Q. G.; HU, T.; ZHOU, X. D. Frequency, species and molecular characterization of oral *Candida* in hosts of different age in China. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 34, n. 6, p. 352-356, 2005.

QUINDÓS, G.; ALONSO-VARGAS, R.; HELOU, S.; ARECHAVALA, A.; MARTÍN-MAZUELOS, E.; NEGRONI, R. Evaluación micológica de un nuevo medio de cultivo cromógeno (Candida ID®) para el aislamiento e identificación presuntiva de *Candida albicans* y otras levaduras de interés médico. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, p. 23-28, 2001.

RAJA, M.; HANNAN, A.; ALI, K. Association of oral candidal carriage with dental caries in children. **Caries research**, v. 44, n. 3, p. 272-276, 2010.

RAMAGE, G.; MARTÍNEZ, J. P.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. **FEMS yeast research**, v. 6, n. 7, p. 979-986, 2006.

RIBEIRO, C. C.; TABCHOURY, C. P.; DEL BEL CURY, A. A.; TENUTA, L.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A. Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. **British Journal of Nutrition**, v. 94, n. 1, p. 44-50, 2005.

RICKARD, A. H., P.; GILBERT, N. J.; HIGH, P. E. KOLENBRANDER; P. S. HANDLEY. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends Microbiol**, v. 11, p. 94-100, 2003.

ROZKIEWICZ, D.; DANILUK, T.; ZAREMBA, M. L.; CYLWIK-ROKICKA, D.; STOKOWSKA, W.; PAWIŃSKA, M.; WASZKIEL, D. Oral *Candida albicans* carriage

in healthy preschool and school children. **Advances in medical sciences**, v. 51, p. 187, 2006.

RUDNEY, J. D.; CHEN, R.; LENTON, P.; LI, J.; LI, Y.; JONES, R. S.; REILLY, C.; FOK, A. S.; APARICIO, C. A reproducible oral microcosm biofilm model for testing dental materials. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, p. 1540–1553, 2012.

SAMARANAYAKE, L. P.; MACFARLANE, T. W. Factors affecting the in-vitro adherence of the fungal oral pathogen *Candida albicans* to epithelial cells of human origin. **Archives of oral biology**, v. 27, n. 10, p. 869-873, 1982.

SAVINI, V.; CATAVITELLO, C.; ONOFRILLO, D.; MASCIARELLI, G.; ASTOLFI, D.; BALBINOT, A.; D'ANTONIO, D. What do we know about *Candida guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p. 434-441, 2011.

SCHALLER, M.; BORELLI, C.; KORTING, H. C.; HUBE, B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 48, n. 6, p. 365-377, 2005.

SCHERER, S ; STEVENS, D. A. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. **Journal of clinical microbiology**, v. 25, n. 4, p. 675-679, 1987.

SEN, B. H.; KAMRAN, E. S.; LARZ, S. W. Growth patterns of *Candida albicans* in relation to radicular dentin. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 84, p. 68-73, 1997.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. Adherence and biofilm formation of non- *Candida albicans* Candida species. **Trends in microbiology**, v. 19, n. 5, p. 241-247, 2011.

SINGH-BABAK, S.; BABAK, T.; DIEZMANN, S.; HILL, J.A.; XIE, J.L.; CHEN, Y.L.; POUTANEN, S.M.; RENNIE, R.P.; HEITMAN, J.; COWEN, L.E. Global analysis of the evolution and mechanism of echinocandin resistance in *Candida glabrata*. **PLoS Pathog**, v.8, n.5, e1002718, 2012.

SOLL, D. R. Candida commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. **Acta Tropica**, v. 81, n. 2, p. 101-110, 2002.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; DI BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; CIRKOVIC, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, p. 891–899, 2007.

STEVENS, D. A.; ODDS, F. C.; SCHERER, S. Application of DNA typing methods to *Candida albicans* epidemiology and correlation with phenotype. **Reviews of Infections Diseases**, v.12, p. 258–266, 1990.

STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 199-210, 2008.

STOODLEY, P.; BOYLE, J. D.; DE BEER, D.; LAPPIN-SCOTT, H. M. "Evolving perspectives of biofilm structure." **Biofouling**, v. 14 n. 1, p. 75-90, 1999.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review in Microbiology**, v. 56, p.187-209, 2002.

SUGITA, T.; NAKAJIMA, M.; IKEDA, R.; MATSUSHIMA, T.; SHINODA, T. Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1826–1830, 2002.

SUNDSTROM, P. Adhesion in *Candida* spp. **Cellular microbiology**, v. 4, n. 8, p. 461-469, 2002.

TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 30, p. 11030-11035. 2004.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TAUBMAN, M. A.; SMITH, D. J. Microbiology of dental caries. In: J. SLOTS and M. A. TAUBMAN (eds.), **Contemporary Oral Microbiology and Immunology**. St. Louis : Mosby-Year Book , 2005. p. 408-421.

TETTELIN, H.; MASIGNANI, V.; CIESLEWICZ, M. J.; DONATI, C.; MEDINI, D.; WARD, N. L.; FRASER, C. M. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 39, p. 13950-13955, 2005.

THURNHEER, T., GMÜR, R., GIERTSEN, E., & GUGGENHEIM, B.. Automated fluorescent in situ hybridization for the specific detection and quantification of oral streptococci in dental plaque. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, n. 1, , p. 39-47, 2001.

THURNHEER, T.; GIERTSEN, E.; GMÜR, R.; GUGGENHEIM, B. Cariogenicity of soluble starch in oral *in vitro* biofilm and experimental rat caries studies: a comparison. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p.829–836, 2008.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia Clínica**. 2 ed. São Paulo: Santos, 1995. 421p.

TROFA, D.; GÁCSE, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. **Clinical microbiology reviews**, v. 21, n. 4, p. 606-625, 2008.



TRONCHIN, G.; PIHET, M.; LOPES-BEZERRA, L. M.; BOUCHARA, J. P. Adherence mechanisms in human pathogenic fungi. **Medical Mycology**, v. 46, n. 8, p. 749-772, 2008.

TSUI, C. K.; DANIEL, H. M.; ROBERT, V.; MEYER, W. Re-examining the phylogeny of clinically relevant *Candida* species and allied genera based on multigene analyses. **FEMS yeast research**, v. 8, n. 4, p. 651-659, 2008.

UEDA, S.; SHIROZA, T.; KURAMITSU, H. K. Sequence analysis of the gtfC gene from *Streptococcus mutans* GS-5. **Gene**, v. 69, n. 1, p. 101-109, 1988.

VACCA SMITH, A. M.; BOWEN, W. H. In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. **Archives of Oral Biology**, v. 45, n. 4, p. 277-291, 2000.

VENKITARAMAN, A. R.; VACCA-SMITH, A. M.; KOPEC, L. K.; BOWEN, W. H. Characterization of glucosyltransferaseB, GtfC, and GtfD in solution and on the surface of hydroxyapatite. **Journal of dental research**, v. 74, n.10, p. 1695-1701, 1995.

VICENTE, V. A. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 137-144, 2008.

VÍLCHEZ, R.; LEMME, A.; BALLHAUSEN, B.; THIEL, V.; SCHULZ, S.; JANSEN, R.; WAGNER-DÖBLER, I. *Streptococcus mutans* Inhibits *Candida albicans* Hyphal Formation by the Fatty Acid Signaling Molecule trans-2-Decenoic Acid (SDSF). **Chem Bio Chem**, v. 11, n. 11, p. 1552-1562, 2010.

WEXLER, D. L.; HUDSON, M. C.; BURNE, R. A. *Streptococcus mutans* fructosyltransferase (ftf) and glucosyltransferase (gtfBC) operon fusion strains in continuous culture. **Infection and immunity**, v. 61, n. 4, p. 1259-1267, 1993.

WHITE TJ, BRUNS T, LEE S, TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications** San Diego: Academic Press, 1990. p. 315–322.

WOLCOTT, R. D.; RUMBAUGH, K. P.; JAMES, G.; SCHULTZ, G.; PHILLIPS, P.; YANG, Q.; WATTERS, C.; STEWART, P. S.; DOWD, S. E. Biofilm maturity studies indicate sharp debridement opens a time- dependent therapeutic window. **J. Wound Care**, v. 19, p. 320–328, 2010.

XAVIER, J. B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J. S.; Van Loosdrecht, M. C. M. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, v. 76, p. 2-13, 2003.

XIAO, J.; KLEIN, M. I.; FALSETTA, M. L.; LU B.; DELAHUNTY, C. M.; YATES, J. R.; HEYDORN, A.; KOO, H. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. **Plos Pathogens**, v. 8, p.1-16, 2012.

YAMADA, T.; KIMURA, S.; IGARASHI, K. Metabolism of glucosylsucrose and maltosylsucrose by *Streptococcus mutans*. **Caries research**, v. 14, n. 5, p. 239-247, 1980.

YANG, Y. L. Virulence factors of *Candida* species. **Journal of Microbiology Immunology and Infection**, v. 36, n. 4, p. 223-228, 2003.

Yang X.Q.; Zhang Q.; Lu L.Y.; Yang R.; Liu Y.; Zou J. Genotypic distribution of *Candida albicans* in dental biofilm of Chinese children associated with severe early childhood caries. **Archives of Oral Biology**, v. 57, n. 8, p.1048-1053, 2012.

YOSHIDA A.; KURAMITSU H. K. Multiple *Streptococcus mutans* genes are involved in biofilm formation, **Applied and Environment Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6283-6291, 2002.

## APÊNDICES

APÊNDICE 1-	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO...	107
APÊNDICE 2-	FICHA DE ANAMNESE E EXAME CLÍNICO.....	108
APÊNDICE 3-	SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS.....	109
APÊNDICE 4-	ANOVA E TESTE DE TUKEY ( $P < 0.05$ ) REFERENTE À COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE FORMAÇÃO DE BIOFILME DOS ISOLADOS DO GÊNERO <i>Candida</i> .....	112
APÊNDICE 5-	ANOVA E TESTE DE TUKEY ( $P < 0.05$ ) DOS ISOLADOS DO GÊNERO <i>Candida</i> REFERENTE À COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE FORMAÇÃO DE BIOFILME DAS CRIANÇAS COM E SEM ATIVIDADE DE CÁRIE.....	114
APÊNDICE 6-	TESTE DE TUKEY ( $P < 0.05$ ) DOS ISOLADOS DO GÊNERO <i>Candida</i> REFERENTE À COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE FORMAÇÃO DE BIOFILME DAS CRIANÇAS COM E SEM HISTÓRICO DE CÁRIE.....	115
APÊNDICE 7-	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DOS ISOLADOS DE <i>S. mutans</i> .....	116
APÊNDICE 8-	ÍNDICES DE CÁRIE DAS CRIANÇAS (n=38) AVALIADAS NESTE ESTUDO E CONCENTRAÇÃO SALIVAR DE <i>S.</i> <i>mutans</i> E LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i> .....	118
APÊNDICE 9-	VALORES MÉDIOS DE ABSORBÂNCIA REFERENTE AO NÚMERO DE CÉLULAS ADERIDAS NOS ENSAIOS DE FORMAÇÃO DE BIOFILME <i>IN VITRO</i> PELOS ISOLADOS DE <i>S. mutans</i> (n=83).....	119
APÊNDICE 10-	ANOVA DOS EXPERIMENTOS DE FORMAÇÃO DE BIOFILME <i>IN VITRO</i> DOS ISOLADOS DE <i>S. mutans</i> SELECIONADOS.....	121
APÊNDICE 11	COMPARAÇÃO DE MÉDIAS DE ISOLADOS DE <i>S. mutans</i> ENTRE CRIANÇAS COINFECTADAS E NÃO COINFECTADAS.....	122

## APÊNDICE 1

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos realizando uma pesquisa vinculada ao Programa de Pós Graduação do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, área de Microbiologia.

O objetivo desta pesquisa é estudar as características de aderência de micro-organismos bucais em crianças com diferentes padrões de atividade de cárie.

Não existem riscos ao paciente relacionados a esta pesquisa, que consiste apenas em coletas de saliva e placa bacteriana. Não será realizado nenhum procedimento clínico em seu filho (a) relacionado a esta pesquisa.

A dentista responsável pela pesquisa, Dicler de Sant'Anna Vitor Barbieri, poderá ser encontrada no telefone 0xx41 3361 1696 no Departamento de Patologia Básica, no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Paraná.

Estão garantidas todas as informações que você queira, antes e depois do estudo. A sua participação é voluntária. Você tem a liberdade de não autorizar sua participação no estudo, ou se aceitar, retirar seu consentimento a qualquer momento.

Os resultados serão divulgados em relatórios, eventos e/ou publicações científicas, sendo isto feito sob forma codificada, para que a confiabilidade seja mantida.

Nenhuma despesa necessária para a realização da pesquisa será de sua responsabilidade. Para sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro.

Eu, \_\_\_\_\_ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado (a) a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper a participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão. Eu concordo e autorizo \_\_\_\_\_ meu \_\_\_\_\_ (s) filhos \_\_\_\_\_

voluntariamente a participar deste estudo.

\_\_\_\_\_  
Data \_\_/\_\_/\_\_

Assinatura do responsável

\_\_\_\_\_  
Data \_\_/\_\_/\_\_

Dicler de Sant'Anna Vitor Barbieri



### APÊNDICE 3

#### SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

##### **Ágar Mitis Salivarius Sacarosado com Bacitracina e Telurito de Potássio (AMSB)**

Ágar Mitis Salivarius 45g

Sacarose 15g

Água Destilada 500mL

Bacitracina (sol. Estoque 50.000 µg/mL) 0,30 mL

Telurito do Potássio(1%) 0,50 MI

O pH foi ajustado para 7,3 -7,4. Autoclavar a 121°C, 1atm, por 20 minutos. Após a autoclavagem o meio foi resfriado até 45°C, para adição da bacitracina, distribuiu-se em placas de Petri pequenas e armazenou-se sob refrigeração a 4 °C (GOLD; JORDAN; VAN HOUTE, 1973).

##### **Caldo BHI (Infusão de Cérebro e Coração) (Newprov)**

BHI pó 37 g

Água Destilada 1000 mL

Para o preparo de Caldo BHI sacarosado foi acrescentado 5% de sacarose durante o preparo do meio. O pH foi ajustado para 7,3 -7,4 e autoclavado.

##### **Caldo Sabouraud**

Peptona 10 g

Dextrose 40 g

Água Destilada 1000 mL

O pH final foi ajustado para 5,6.

Para o Ágar Sabouraud, acrescentar 15g de ágar simples para cada 1000 mL de meio. O pH foi ajustado para 7,3 -7,4. Autoclavar a 121 °C, 1atm, por 20 minutos.

##### **CHROMagar Candida®**

CHROMagar Candida 20 g

Água Destilada 250 mL

Aquecer sem fervura ( $< 100^{\circ}\text{C}$ ) até dissolução completa. Autoclavar a  $121^{\circ}\text{C}$ , 1 atm, por 15 minutos.

**Skim Milk Powder (Difco®)**

Skim Milk 100 g

Água Destilada 1000 mL

Aquecer para facilitar a dissolução completa do pó. Autoclavar a  $121^{\circ}\text{C}$ , 1 atm, por 15 minutos.

**Tampão Fosfato Salino (PBS)**

Água Destilada 1000 mL

NaCl 8g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,15g

KCl 0,2g

$\text{NaNO}_3$  0,2g

Misturar todos os ingredientes e ajustar o pH para 6,8. Autoclavar.

**Fixador de Karnovisk**

Glutaraldeído 25% 10 mL

Paraformaldeído 10% 20 mL

Tampão Cacodilato de Sódio 0,2M 25 mL

$\text{CaCl}_2$  0,1M 1mL

Água Bidestilada 44 mL

Fixação: Deixar o espécime fixando na solução por no mínimo 24 horas. Lavar 2 a 3 vezes no tampão cacodilato de sódio 0,05 M e proceder a desidratação.

**Água Peptonada**

Triptona 2,5 g

Peptona 2,5 g

NaCl 5,0 g

Água Destilada 1000 mL

**Tampão TBE 5x (estoque):**

Água Milli Q	1000 mL
Tris- base	54 g
Ácido Bórico	27,5 g
EDTA 0,5M	20,0 mL

Dissolver os sais em 800 mL de água milliQ agitando. Completar o volume com água milliQ para 1000 mL

**Tampão TBE 1x:**

Água Milli Q	400 mL
TBE 5x	100 mL

**Gel de Agarose**

Colocar a quantidade de agarose em um erlenmeyer e adicionar a quantidade de TBE 1x:

Visualização DNA	0,8 g Agarose	2,4 g Agarose
	100 mL TBE 1X	300 mL TBE 1X
PCR e Purificação PCR	1,4 g Agarose	4,2 g Agarose
	100 mL TBE 1X	300 mL TBE 1X



## APÊNDICE 04

### ANOVA E TESTE DE TUKEY ( $P < 0.05$ ) REFERENTE À COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE FORMAÇÃO DE BIOFILME DOS ISOLADOS DO GÊNERO *Candida*

#### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	30	15.90893	0.53030	83.4159 **
Resíduo	62	0.39415	0.00636	
Total	92	16.30308		

\*\* SIGNIFICATIVO AO NÍVEL DE 1% DE PROBABILIDADE ( $p < .01$ )

(FV): Fonte de variação; (GL): Graus de liberdade; (SQ): Soma de quadrado; (QM): Quadrado médio

(F): Estatística do teste F

#### TESTES DAS MÉDIAS

LMICRO501	1.40460	a
LMICRO502	1.19873	abcd
LMICRO503	0.74033	gh
LMICRO504	0.31590	ij
LMICRO505	1.14500	bcdef
LMICRO506	1.09897	bcdef
LMICRO507	1.04693	bcdef
LMICRO508	0.07603	j
LMICRO509	1.28967	ab
LMICRO510	0.97310	defg
LMICRO511	1.02450	cdef
LMICRO512	1.20740	abcd
LMICRO513	0.98030	defg
LMICRO514	1.09540	bcdef
LMICRO515	0.07573	j
LMICRO516	1.09213	bcdef
LMICRO517	0.74980	gh
LMICRO518	1.12043	bcdef
LMICRO519	1.22527	abcd
LMICRO520	0.94003	efg
LMICRO521	1.05477	bcdef
LMICRO522	1.24857	abc
LMICRO523	0.07560	j
LMICRO524	1.17483	abcde
LMICRO525	1.13383	bcdef
LMICRO526	0.52253	hi
LMICRO527	0.89100	fg
LMICRO528	1.04303	bcdef

Continua

Continuação		
TESTES DAS MÉDIAS		
LMICRO529	0.49803	hi
LMICRO530	0.07597	j
LMICRO531	0.07427	j

AS MÉDIAS SEGUIDAS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI.  
 FOI APLICADO O TESTE DE TUKEY AO NÍVEL DE 5% DE PROBABILIDADE  
 MÉDIA GERAL: 0.85783; COEFICIENTE DE VARIAÇÃO %: 9.29; PONTO MÉDIO: 0.74565  
 DIFERENÇA MÍNIMA SIGNIFICATIVA: 0.25718; DMS: 0.25718

## APÊNDICE 05

ANOVA E TESTE DE TUKEY ( $P < 0.05$ ) DOS ISOLADOS DO GÊNERO *Candida* REFERENTE À COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE FORMAÇÃO DE BIOFILME DAS CRIANÇAS COM E SEM ATIVIDADE DE CÁRIE

### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	01	0.10868	0.10868	2.8411 ns
Resíduo	29	1.10934	0.03825	
Total	30	1.21802		

NS: NÃO SIGNIFICATIVO ( $p \geq .05$ )

(FV): FONTE DE VARIAÇÃO; (GL): GRAUS DE LIBERDADE; (SQ): SOMA DE QUADRADO; (QM): QUADRADO MÉDIO; (F): ESTATÍSTICA DO TESTE F

### MÉDIAS E MEDIDAS

#### Médias de tratamento

1	1.10434 a	nr = 20 (Com atividade de cárie)
2	1.22809 a	nr = 11 (Sem atividade de cárie)

Diferença mínima significativa (dms) =  $0.40026 \times \text{RaizQuadrd}(1/\text{nr1} + 1/\text{nr2})$  Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas; nr = número de repetições do tratamento. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade; Média geral (MG): 1.14825; Coeficiente de variação%: 17.03; Ponto médio: 1.06893

## APÊNDICE 06

TESTE DE TUKEY ( $P < 0.05$ ) DOS ISOLADOS DO GÊNERO *Candida* REFERENTE À COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE FORMAÇÃO DE BIOFILME DAS CRIANÇAS COM E SEM HISTÓRICO DE CÁRIE

### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

#### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	0.03863	0.03863	0.9499 ns
Resíduo	29	1.17939	0.04067	
Total	30	1.21802		

NS: NÃO SIGNIFICATIVO ( $p \geq .05$ )

(FV): Fonte de variação; (GL): Graus de liberdade; (SQ): Soma de quadrado; (QM): Quadrado médio

(F): Estatística do teste F

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	1.12743 a	nr = 23 (Com histórico de cárie)
2	1.20811 a	nr = 8 (Sem histórico de cárie)

$dms = 0.41270 \times \text{Raiz Quadrada} (1/nr1 + 1/nr2)$  Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas; nr = número de repetições do tratamento  
 Média geral (MG): 1.14825; Coeficiente de variação%: 17.56; Ponto médio: 1.06893

## APÊNDICE 7

### CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DOS ISOLADOS DE *S.mutans*

Número do isolado	Amostra clínica	B / S	Morf Col.	Catalase	Resistência Bacitracina	Fermentação Manitol	Fermentação Sorbitol	Hidrolise Esculina	Hidrolise Arginina
1	1	S	Punt	+	+	+	+	+	-
2	1	B	Punt	+	+	+	+	+	-
3	2	S	Med	+	+	+	+	+	-
4	6	S	Punt	+	+	+	+	+	-
5	3	B	Peq	+	+	+	+	+	-
6	3	S	Peq	+	+	+	+	+	-
7	3	S	Grd	+	+	+	+	+	-
8	4	S	Punt	+	+	+	+	+	-
9	4	B	Peq	+	+	+	+	+	-
10	4	B	Med	+	+	+	+	+	-
11	5	B	Med	+	+	+	+	+	-
12	31	B	Punt	+	+	+	+	+	-
13	5	S	Punt	+	+	+	+	+	-
14	32	B	Grd	+	+	+	+	+	-
15	6	B	Grd	+	+	+	+	+	-
16	6	B	Punt	+	+	+	+	+	-
17	7	S	Punt	+	+	+	+	+	-
18	8	S	Punt	+	+	+	+	+	-
19	8	B	Grd	+	+	+	+	+	-
20	9	S	Peq	+	+	+	+	+	-
21	14	B	Peq	+	+	+	+	+	-
22	9	S	Med	+	+	+	+	+	-
23	20	B	Punt	+	+	+	+	+	-
24	10	S	Punt	+	+	+	+	+	-
25	10	B	Grd	+	+	+	+	+	-
26	35	S	Punt	+	+	+	+	+	-
27	11	S	Peq	+	+	+	+	+	-
28	12	S	Med	+	+	+	+	+	-
29	12	S	Med	+	+	+	+	+	-
30	13	B	Peq	+	+	+	+	+	-
31	13	S	Punt	+	+	+	+	+	-
32	14	B	Punt	+	+	+	+	+	-
33	15	B	Punt	+	+	+	+	+	-
34	15	S	Peq	+	+	+	+	+	-
35	16	S	Peq	+	+	+	+	+	-
36	16	B	Med	+	+	+	+	+	-
37	17	S	Punt	+	+	+	+	+	-
38	17	S	Punt	+	+	+	+	+	-
39	18	B	Punt	+	+	+	+	+	-

Continua

Continuação

Número do isolado	Amostra clínica	B / S	Morf Col.	Catalase	Resistência Bacitracina	Fermentação Manitol	Fermentação Sorbitol	Hidrolise Esculina	Hidrolise Arginina
40	18	S	Punt	+	+	+	+	+	-
41	19	S	Med	+	+	+	+	+	-
42	19	B	Peq	+	+	+	+	+	-
43	20	S	Peq	+	+	+	+	+	-
44	20	B	Peq	+	+	+	+	+	-
45	21	S	Med	+	+	+	+	+	-
46	21	S	Punt	+	+	+	+	+	-
47	22	B	Punt	+	+	+	+	+	-
48	22	S	Punt	+	+	+	+	+	-
49	23	B	Punt	+	+	+	+	+	-
50	23	S	Grd	+	+	+	+	+	-
51	24	S	Med	+	+	+	+	+	-
52	24	S	Med	+	+	+	+	+	-
53	24	B	Med	+	+	+	+	+	-
54	25	S	Peq	+	+	+	+	+	-
55	25	S	Med	+	+	+	+	+	-
56	26	S	Punt	+	+	+	+	+	-
57	26	S	Med	+	+	+	+	+	-
58	27	S	Punt	+	+	+	+	+	-
59	27	B	Peq	+	+	+	+	+	-
60	28	B	Med	+	+	+	+	+	-
61	28	S	Peq	+	+	+	+	+	-
62	29	S	Punt	+	+	+	+	+	-
63	29	B	Peq	+	+	+	+	+	-
64	30	S	Grd	+	+	+	+	+	-
65	30	B	Punt	+	+	+	+	+	-
66	31	S	Punt	+	+	+	+	+	-
67	31	B	Punt	+	+	+	+	+	-
68	32	S	Med	+	+	+	+	+	-
69	32	S	Peq	+	+	+	+	+	-
70	33	S	Peq	+	+	+	+	+	-
71	33	B	Punt	+	+	+	+	+	-
72	34	S	Punt	+	+	+	+	+	-
73	34	B	Punt	+	+	+	+	+	-
74	34	S	Punt	+	+	+	+	+	-
75	35	S	Med	+	+	+	+	+	-
76	35	S	Peq	+	+	+	+	+	-
77	36	S	Peq	+	+	+	+	+	-
78	36	B	Punt	+	+	+	+	+	-
79	36	B	Punt	+	+	+	+	+	-
80	37	S	Grd	+	+	+	+	+	-
81	37	B	Punt	+	+	+	+	+	-
82	38	S	Punt	+	+	+	+	+	-
83	38	S	Punt	+	+	+	+	+	-

## APÊNDICE 8

ÍNDICES DE CÁRIE DAS CRIANÇAS (n=38) AVALIADAS NESTE ESTUDO E CONCENTRAÇÃO SALIVAR DE *S. mutans* E LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*

Crianças	<i>S. mutans</i> UFC/mL Saliva	Gênero <i>Candida</i> UFC/mL saliva	Dentes com experiência de cárie	Presença de lesão ativa de cárie	Idade	CPO- D	ceo-d
1 (13**)	2,8x10 <sup>3</sup>	-	Sim	Não	10	0	1
2 (14**)	3,6x10 <sup>2</sup>	-	Sim	Não	10	0	1
3 (1*)	6,8x10 <sup>3</sup>	163	Sim	Sim	10	1	1
4 (2*)	7,3x10 <sup>3</sup>	142	Sim	Não	9	2	1
5 (3*)	5,2x10 <sup>5</sup>	112	Sim	Sim	9	3	1
6 (15**)	3,6x10 <sup>2</sup>	-	Sim	Não	9	0	1
7	4,1x10 <sup>4</sup>	-	Sim	Sim	9	3	2
8 (4*)	5,2x10 <sup>3</sup>	298	Sim	Não	9	0	0
9 (16**)	5,8x10 <sup>2</sup>	-	Não	Não	10	0	0
10 (5*)	8,3x10 <sup>4</sup>	245	Não	Não	10	0	0
11 (6*)	6,7x10 <sup>4</sup>	148	Não	Não	9	0	0
12 (7*)	4,6x10 <sup>5</sup>	180	Sim	Sim	9	2	2
13	2,3x10 <sup>3</sup>	-	Não	Não	9	1	2
14 (17**)	3,1x10 <sup>4</sup>	-	Sim	Sim	9	3	3
15 (19**)	2,2x10 <sup>3</sup>	-	Não	Não	11	0	0
16	3,8x10 <sup>2</sup>	-	Não	Não	10	1	2
17	3,4x10 <sup>2</sup>	-	Não	Não	11	0	0
18	2,6x10 <sup>2</sup>	-	Não	Não	11	0	0
19	6,8x10 <sup>3</sup>	-	Sim	Sim	11	2	2
20 (18**)	7,2x10 <sup>4</sup>	-	Sim	Sim	10	3	3
21	3,8x10 <sup>4</sup>	-	Não	Não	10	3	3
22 (8*)	4,8x10 <sup>5</sup>	220	Sim	Sim	9	3	2
23	3,3x10 <sup>3</sup>	-	Não	Não	9	3	2
24	5,3x10 <sup>3</sup>	-	Não	Não	9	0	0
25	2,6x10 <sup>3</sup>	-	Não	Não	11	1	2
26	3,2x10 <sup>2</sup>	-	Não	Não	11	1	1
27 (9*)	3,3x10 <sup>4</sup>	330	Sim	Sim	8	4	2
28 (20**)	4,5x10 <sup>5</sup>	-	Sim	Sim	8	1	2
29	4,8x10 <sup>2</sup>	-	Sim	Não	8	1	0
30	3,7x10 <sup>3</sup>	-	Sim	Não	8	0	2
31 (10*)	4,2x10 <sup>5</sup>	130	Sim	Sim	8	0	3
32 (11*)	5,4x10 <sup>4</sup>	210	Sim	Sim	8	4	3
33	5,8x10 <sup>4</sup>	-	Sim	Sim	9	4	2
34	6,7x10 <sup>2</sup>	-	Sim	Sim	9	0	2
35 (12*)	1,4x10 <sup>3</sup>	140	Sim	Sim	9	1	2
36	3,2x10 <sup>3</sup>	-	Sim	Sim	11	1	2
37	7,2x10 <sup>2</sup>	-	Sim	Sim	9	1	1
38	8,4x10 <sup>2</sup>	-	Sim	Sim	9	1	1

(\*) CRIANÇAS COINFECTADAS. (\*\*) CRIANÇAS SEM COINFEÇÃO. NÚMEROS APRESENTADOS ENTRE PARÊNTESES CORRESPONDEM AO NÚMERO DAS CRIANÇAS SELECIONADAS PARA A AVALIAÇÃO DOS ISOLADOS EM ESTUDO APRESENTADOS NAS TABELAS 8 E 10 DO CORPO DO TEXTO.

## APÊNDICE 9

VALORES MÉDIOS DE ABSORBÂNCIA REFERENTE AO NÚMERO DE CÉLULAS ADERIDAS NOS ENSAIOS DE FORMAÇÃO DE BIOFILME *IN VITRO* PELOS ISOLADOS DE *S. mutans* (n=83)

N- ISOLADO	ABS (575nm) MÉDIA	DESVIO PADRÃO
1	1,3054334	0,016031329
2	1,2925667	0,017341929
3	1,2284333	0,006975895
6	1,1416333	0,04629873
7	1,1654334	0,031674157
9	1,3655333	0,091291114
10	1,4721333	0,313968846
11	1,1266667	0,064501483
12	1,3777	0,011677299
13	1,4916	0,165482265
14	1,0541667	0,076501363
15	1,085	0,00501198
16	1,2128666	0,045579867
17	1,2328	0,048127773
18	1,3175	0,018101653
19	0,7899667	0,01793164
20	1,2309333	0,064379538
21	1,2336333	0,034240378
22	1,7628333	0,155412252
23	1,1792667	0,031497641
24	1,3131334	0,100870209
25	1,2331	0,047204398
26	1,2552	0,071307124
27	1,3062	0,042429342
28	0,9005333	0,021607722
29	1,5835333	0,024768771
30	0,9825	0,029347555
31	1,2923333	0,05211155
32	1,1163	0,032940516
33	0,6592667	0,039562
34	0,607266	0,08050926
35	1,2415666	0,0156698
36	1,219999	0,2181503
37	1,337500	0,026863
38	1,294266	0,01379503
39	1,486700	0,0397393
40	Sem leitura	-
41	1,76400	0,0313450
42	0,8763333	0,07871671
43	1,1586000	0,1697049
44	0,450200	0,034888
45	1,2890333	0,011955
46	1,643266	0,0248775

Continua



Continuação		
N- ISOLADO	ABS (575nm) MÉDIA	DESVIO PADRÃO
47	0,752099	0,572900
48	1,024533	0,002759
49	1,426033	0,076247
50	Sem leitura	-
51	0,64336	0,029682
52	1,060200	0,0446187
53	0,391766	0,497341
54	1,3160333	0,045268
55	Sem leitura	-
56	0,399533	0,497857
57	1,529533	0,067866
58	0,42300	0,582579
59	0,684333	0,24090
60	0,865133	0,374358
61	0,337033	0,70954
62	Sem leitura	-
63	0,99196	0,015374
64	1,216766	0,067419
65	1,35786	0,01647
66	0,86890	0,0167439
67	1,058100	0,114869
68	0,97696	0,4709592
69	Sem leitura	-
70	0,31883	0,43995
71	1,135166	0,608396
72	1,357866	0,0164731
73	1,357866	0,016473
74	0,523099	0,077756
75	1,357866	0,0164731
76	1,357866	0,01647
77	0,788899	0,067866
78	1,35786	0,016473
79	0,41376	0,574031
80	0,6837999	0,466183
81	1,317966	0,017892
82	Sem leitura	-
83	0,6108	0,091940
UA159	1,20176	0,66571

## APÊNDICE 10

### ANOVA DOS EXPERIMENTOS DE FORMAÇÃO DE BIOFILME *IN VITRO* DOS ISOLADOS DE *S. mutans* SELECIONADOS

#### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	19	3.66112	0.19269	6.7197 **
Resíduo	40	1.14703	0.02868	
Total	59	4.80815		

\*\* SIGNIFICATIVO AO NÍVEL DE 1% DE PROBABILIDADE ( $p < .01$ );

(FV): Fonte de variação; (GL): Graus de liberdade; (SQ): Soma de quadrado; (QM): Quadrado médio

(F): Estatística do teste F

GL	GLR	F-crit	F	p
19	40	2.393	6.7197	<0.001

#### TESTES DAS MÉDIAS

LMICRO06-SM	1.14163	abcde
LMICRO09-SM	1.36553	ab
LMICRO11-SM	1.12667	abcde
LMICRO19-SM	0.78997	cde
LMICRO24-SM	1.31313	abc
LMICRO27-SM	1.30620	abc
LMICRO29-SM	1.58353	a
LMICRO47-SM	0.75210	de
LMICRO59-SM	0.68433	e
LMICRO12-SM	1.37770	ab
LMICRO14-SM	1.05417	bcde
LMICRO26-SM	1.25520	abcd
LMICRO02-SM	1.29257	abc
LMICRO03-SM	1.22843	abcd
LMICRO04-SM	1.06853	abcde
LMICRO20-SM	1.23093	abcd
LMICRO21-SM	1.23363	abcd
LMICRO23-SM	1.17927	abcde
LMICRO33-SM	0.65927	e
LMICRO60-SM	0.86513	bcde

AS MÉDIAS SEGUIDAS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI. FOI APLICADO O TESTE DE TUKEY AO NÍVEL DE 5% DE PROBABILIDADE.

MÉDIA GERAL: 1.12538; COEFICIENTE DE VARIAÇÃO %: 15.05; DIFERENÇA MÍNIMA SIGNIFICATIVA: 1.52404; Ponto médio: 0.85015

## APÊNDICE 11

### COMPARAÇÃO DE MÉDIAS DE ISOLADOS DE *S. mutans* ENTRE CRIANÇAS COINFECTADAS E NÃO COINFECTADAS

#### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

##### QUADRO DE ANÁLISE

	FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1		0.00224	0.00224	0.1371 ns
Resíduo	18		0.29384	0.01632	
Total		19	0.29607		

NS NÃO SIGNIFICATIVO ( $p \geq .05$ )

(FV): FONTE DE VARIAÇÃO; (GL): GRAUS DE LIBERDADE; (SQ): SOMA DE QUADRADO; (QM): QUADRADO MÉDIO; (F): ESTATÍSTICA DO TESTE F

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	1.06248 a	nr = 12 (Coinfecção)
2	1.04089 a	nr = 8 (Sem coinfecção)

DMS =  $0.26832 \times \text{RAIZ QUADRADA } (1/\text{NR1} + 1/\text{NR2})$  ONDE NR1 E NR2 SÃO OS NÚMEROS DE REPETIÇÕES DE DUAS MÉDIAS COMPARADAS; NR = NÚMERO DE REPETIÇÕES DO TRATAMENTO; MÉDIA GERAL (MG): 1.05385; COEFICIENTE DE VARIAÇÃO%: 12.12; PONTO MÉDIO: 1.03517; FOI APLICADO O TESTE DE TUKEY AO NÍVEL DE 5% DE PROBABILIDADE

## ANEXOS

ANEXO 1-	APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	124
ANEXO 2-	Antiadherent activity of <i>Schinus terebinthifolius</i> and <i>Croton urucurana</i> extracts <i>in vitro</i> biofilm formation of <i>Candida albicans</i> and <i>Streptococcus mutans</i> .....	125

## ANEXO 1

## APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Diretoria do Setor de Ciências da Saúde

## PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO SCS/UFPR

Projeto: 014SI.014-03-11

Tipo/ local: Ciências Biológicas / Odonto

Título: OCORRÊNCIA DE COINFEÇÃO ENTRE STREPTOCOCCUS MUTAUS E CANDIDA ALBICAUS EM CRIANÇAS COM ALTO RISCO À CÁRIE E SUA RELAÇÃO COM A ADERÊNCIA NA SUPERFÍCIE CORONÁRIA DENTAL.

Autor: DICLER DE SANT'ANA VITOR BARBIERI

RELATOR: IARA MARIL PEREIRA MACHADO

DATA ENTREGA AO CEP: 12-11-03

ENTREGA AO RELATOR:

RELATOR DEV. CEP:

## PARECER DO RELATOR:

O presente projeto por mim avaliado e está em conformidade com a Resolução 196/96 do CNS. Entretanto a aprovação dependerá do atendimento aos itens pendentes, relacionados abaixo:

- ① Esclarecimento quanto a vinculação e coexistência do presente projeto no âmbito de concessão conjunta que o autor tem e a professora Tereza Stenile, mas no projeto o autor tem e o professor Fabiano C. Traiz.
- ② No termo de consentimento e de assentimento de todos sujeitos háves e consentimento de menor, fundamentado com a responsabilidade.
- ③ Esclarecer e declarar que os microrganismos levados ao final do projeto e como eles serão manipulados e controlados durante o desenvolvimento do trabalho prático.
- ④ Esclarecimento com relação a duração de dados permanentes de crianças de 0 a 6 anos.

10/12/03  
APROVADO NÃO APROVADO Relator / assinatura e identificação Data: 24/09/03

Parecer da Comissão Aprovado não aprovado<sup>21</sup>

Assinatura do presidente Encaminhar para: Data: \_\_/\_\_/\_\_

Reapresentação e complementação do projeto: Em 13/02/2004

Todos os itens foram esclarecidos

13/02/04 Iara M. P. Machado 13/02/04  
APROVADO NÃO APROVADO Relator / assinatura e identificação Data

Assinatura do presidente  
CEP/HC-UFPR

Encaminhar para: Data: \_\_/\_\_/\_\_

Recebido em 30/03/04

Wilder J. S. Barbosa

## ANEXO 2

### **Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on *in vitro* biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans***

Dicler S.V. Barbieri<sup>1</sup>; Fabiana Tonial<sup>1,2</sup>; Patricia V.A. Lopez<sup>1,3</sup>; Beatriz H.L.N.Sales Maia<sup>4</sup>; Germana D. Santos<sup>1</sup>; Marina O. Ribas<sup>5</sup>; \*Chirlei Glienke<sup>2</sup>; \*Vania A. Vicente<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>Post-graduation Program Microbiology, Parasitology and Pathology, Basic Pathology Department, Federal University of Parana State, Paraná, Brazil. <sup>2</sup>Department of Genetics, Federal University of Parana State, Paraná, Brazil. <sup>3</sup>Tropical Medicine Institute, Assunção, Paraguai. <sup>4</sup>Department of Chemistry, Federal University of Parana State, Paraná, Brazil. <sup>5</sup>School of Health and Biological Sciences-Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Brazil. <sup>6</sup>Fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasília, Brazil

#### **Correspondent author:**

\*Professor Dr. Vania Aparecida Vicente, Post-graduation Program Microbiology, Parasitology and Pathology, Basic Pathology Department, Federal University of Parana State, Paraná, Brazil.

Box:19031, post code: 81.531-980, Curitiba, PR, Brazil; Tel: [+55 41 3361.1696](tel:+554133611696) / Fax [+55 41 3266.2042](tel:+554132662042) / e-mail: [vaniava63@gmail.com](mailto:vaniava63@gmail.com)

#### **ACEITO PARA PUBLICAÇÃO: Archives of Oral Biology**

#### **Abstract**

**Objective:** To evaluate the antiadherent property of crude, methanol and acetate methanol extract fractions from *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* in hydroalcoholic (HA) and dimethylsulfoxide (DMSO) solvents on *in vitro* biofilms formed by *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* strains.

**Design:** The minimal concentration of adherence (MICA) was determined to evaluate the antiadherent potential of extracts on the *in vitro* biofilm formation. The extracts of plants were subjected to thin layer chromatography (TLC) in order to detect what class of compounds was responsible for the antiadherent activity. Data was estimated by analysis of variance (ANOVA) complemented by Tukey test level of significance set at 5%.

**Results:** Both plants demonstrated inhibition of *S. mutans* and *C. albicans* on *in vitro* biofilm formation. The biofilms of *C. albicans* were more efficiently inhibited by the *S. terebinthifolius* fraction of acetate-methanol and methanol in hydroalcoholic solvents ( $p < 0.05$ ). The *S. mutans* biofilms adherence was best inhibited by the *S. terebinthifolius* crude extract and its methanolic fraction, both in hydroalcoholic solvent ( $p < 0.05$ ). TLC of crude extracts and fractions of *S. terebinthifolius* detected the presence of several active compounds, including phenolic compounds, anthraquinones, terpenoids, and alkaloids. *C. urucurana* extracts confirmed activity for both microorganisms ( $p < 0.05$ ). However, higher concentrations were needed to achieve antiadherent activity, mainly to inhibit *in vitro* biofilm formation of *C. albicans*.

**Conclusion:** The antiadherent potential of both plants on *in vitro* biofilms formed by *C. albicans* and *S. mutans* were confirmed, suggesting the importance of studies about these extracts for therapeutic prevention of oral diseases associated with oral biofilms.

**Key words:** adherence, biofilm, plant extracts, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*

Running title: **Antiadherent activity of folk plants**